



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Joris Irvoas

le mardi 12 mars 2013

Titre :

Synthèse et Assemblage de Molécules Hybrides Complexe de Ruthénium/ADN

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SDM : Chimie, Biologie, Santé - CO 042

Unité de recherche :

IMRCP - Laboratoire des Interactions Moléculaires et de la Réactivité Chimique et Photochimique

Directeur(s) de Thèse :

Valérie Sartor

Jury :

Dr. Ulysse Asseline, CBM, Orléans, Rapporteur

Pr. Frédérique Loiseau, DCM, Grenoble, Rapporteur

Pr. Peter Faller, LCC, Toulouse, Président du jury

Pr. Michael Smietana, IBMM, Montpellier, Examineur

Dr. Jean-Marc Escudier, SPCMIB, Toulouse, Examineur

Dr. Valérie Sartor, IMRCP, Toulouse, Directrice de thèse

Remerciements

En premier lieu, je voudrais remercier ma directrice de thèse, le Dr. Valérie Sartor, de m'avoir confié ce projet. Ta disponibilité, tes conseils et ton support m'ont permis d'accomplir le présent travail. Tu as laissé libre cours à ma spontanéité et mes aspirations tout en m'aiguillant intelligemment sur le chemin me permettant de combler mes attentes scientifiques. Tu m'as ainsi apporté énormément aussi bien sur l'aspect technique que sur l'aspect scientifique en me montrant les différents chemins permettant d'atteindre un même objectif. Enfin, merci de ta bonne humeur.

Je remercie le Dr. Ulysse Asseline du CNRS d'Orléans et le Pr. Frédérique Loiseau de l'université Joseph Fourier de Grenoble d'avoir accepté d'évaluer le présent manuscrit. Je remercie également le Pr. Michael Smietana de l'université de Montpellier pour son intérêt sur mes travaux et pour avoir fait partie intégrante du jury. Je remercie le Pr. Peter Fallor d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse. Je remercie enfin le Dr. Jean-Marc Escudier, également membre du jury, pour son aide, sa bonne humeur et pour son apport scientifique.

Je remercie le Dr. Monique Mauzac, directrice du laboratoire des IMRCP, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Ma gratitude va également aux membres de l'ancienne équipe PEP, le Dr. Esther Oliveiros, le Pr. Nadia Chouini-Lalanne, le Dr. Marie-Thérèse Maurette, le Dr. Patricia Vicendo pour ne citer qu'elles, qui m'ont accueilli et aiguillé pendant bon nombre d'années. Elles m'ont permis une intégration rapide et agréable au sein du laboratoire. Je les remercie également pour leurs conseils scientifiques avisés ainsi que pour leur bonne humeur.

Je remercie le Dr. Christophe Coudret, membre du laboratoire des IMRCP, pour ses discussions scientifiques, mais également philosophiques, son sens de l'humour et sa bonne humeur de tous les jours. Je pense également à tous les membres permanents du laboratoire qui m'ont accueilli, aiguillé et aidé au cours de ces travaux, notamment le Pr. Véronique Pimienta, le Dr. Christophe Mingotaud, Arielle, Charles-Louis, Yann, Fernanda ou encore Florence, je ne peux citer tout le monde tant ils sont nombreux.

À la fin de l'année 2009, j'ai pu partager le quotidien de l'équipe du Dr. Andres Thomas de l'INIFTA à La Plata en Argentine. Je vous remercie de m'avoir si bien accueilli. Les deux mois et demi passés à l'institut m'ont permis d'ouvrir mon horizon

scientifique, mais également de m'ouvrir aux argentins, à une autre culture et à de magnifiques panoramas.

Je remercie chaleureusement le Dr. Chantal Zedde, du service commun d'HPLC, pour son aide, son enseignement et sa disponibilité. Je remercie également les membres du service commun de spectrométrie de masse pour l'aide qu'ils m'ont apportée.

Je pense à tous les étudiants qui ont croisé ma route durant ces années de travail avec lesquels j'ai pu échanger et décompresser. Notamment José, Menana, Rawad, Sarmenio, Sheila, Renée, Alex, Marie-Anne, Félix, Marion, Jérôme, Arnaud, Véronique, Guillaume, Claire, Marie, Camille. J'en oublie certainement, mais merci à tous pour votre bonne humeur, votre écoute et vos coups de gueule.

Je remercie bien évidemment ma famille pour son soutien et pour son aide. Merci Maman, Papa, Morgane et Erwan. Mes amis également, car même s'ils sont complètement extérieurs à ces travaux, ils n'en restent pas moins des piliers essentiels à ma vie. Merci Émilie, Amandine, Louise, Marie-Estelle, et Aurélie pour ta présence. Merci Nicolas, Benoit, Damien, Pierre. Merci à tous les autres que je n'ai pas la place de citer. Enfin merci Laure, ton soutien m'a permis d'achever ce travail en toute sérénité, merci de ta présence et de ton écoute de tous les instants !

Je remercie enfin l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) pour le financement de ces travaux.

Cette thèse a été un magnifique voyage scientifique, mais également une expérience sociale inoubliable. Je vous remercie tous, vous qui avez fait partie de cette aventure.

Table des matières

Table des matières

Abréviations	1
Introduction générale	1
Chapitre 1	
ADN et chimie supramoléculaire	7
1. Introduction	9
1.1. Chimie supramoléculaire de structure	9
1.2. ADN et structure	9
1.2.1. Généralités et considérations structurales	9
1.2.2. Synthèse automatisée d'oligonucléotides.....	11
1.2.3. Sticky ends (ou bouts collants) et ligases	12
2. Assemblages à base d'ADN	13
2.1. Deux structures de départ importantes.....	13
2.2. Four-way junctions (4WJ)	13
2.3. Double cross-over ou DX	15
2.4. DX et 4-way junctions	16
2.5. Extension de ces méthodes.....	18
2.5.1. Extension des structures DX à plus de deux double-hélices.....	18
2.5.2. Formation de nanotubes à base de jonctions DX	20
2.5.3. Formation d'un maillage hexagonal	22
2.6. Structuration à partir du simple duplex.....	24

2.6.1. Origami	24
2.6.2. Structuration de polymères	26
2.6.3. La formation de structures cycliques	30
2.6.4. Du cycle à la structure géométrique tridimensionnelle	32
2.6.5. Structures géométriques 3D	33
2.7. Conclusions	36
3. ADN et métaux : structuration	37
3.1. M-DNA : incorporation d'atomes métalliques au sein du double-brin	37
3.2. Modification de bases : incorporation contrôlée d'atomes métalliques.....	38
3.2.1. Insertion de bases artificielles au sein de la double-hélice d'ADN	38
3.2.2. Modification des bases pour insertion d'un métal externe à la double-hélice	41
3.3. Liaison oligonucléotide – complexe métallique	42
3.3.1. Objets linéaires	42
3.3.2. Structures sur 2 et 3 dimensions	45
4. Conclusions.....	50

Chapitre 2

Synthèses de molécules hybrides Complexe de Ruthénium – Oligonucléotides.....57

1. Introduction	59
1.1. Stratégies de synthèses	59
1.1.1. Réaction d'amidation	59
1.1.2. Réaction de Click chemistry	60
2. Synthèse des complexes de ruthénium	62
2.1. Complexe de ruthénium fonctionnalisé par des fonctions acide carboxylique....	62
2.2. Complexes de ruthénium fonctionnalisés par des alcynes	62
2.3. Complexes de ruthénium fonctionnalisés par des fonctions azoture	65

2.3.1. Première stratégie de synthèse	65
2.3.2. Deuxième stratégie de synthèse	69
2.3.3. Troisième stratégie de synthèse	69
3. Les oligonucléotides fonctionnalisés	70
3.1. Fonctionnalisation par un groupement amine	70
3.2. Fonctionnalisation par un groupement alcyne	72
3.3. Fonctionnalisation par un groupement azoture	73
4. Synthèses des briques d'assemblage Ru-ODN	73
4.1. Synthèses par une réaction d'amidation	74
4.1.1. Synthèses	74
4.1.2. Caractérisation	75
4.2. Synthèses par une réaction CuAAC	80
4.2.1. La réaction de click chemistry	80
4.2.2. Synthèse	81
4.2.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	87
5. Conclusions sur la synthèse d'hybrides ruthénium/ADN	89

Chapitre 3

Construction d'assemblages Ru-ODN linéaires et en étoile 93

1. Assemblages linéaires	95
1.1. Synthèses des assemblages linéaires	95
1.1.1. Séquences des briques d'assemblage Ru-ODN utilisées	95
1.1.2. Conditions d'hybridation	96
1.1.3. Assemblages formés à l'aide des complexes Ruthénium mono-ODN	97
1.1.4. Assemblages formés à l'aide des complexes Ruthénium bis-ODNs	97
1.2. Caractérisations des assemblages linéaires	100
1.2.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	100

1.2.2. Température de dénaturation	102
1.2.3. Dichroïsme circulaire	107
1.2.4. Spectrophotométrie de luminescence.....	110
1.3. Conclusion sur les assemblages linéaires.....	110
2. Assemblages en étoile	111
2.1. Synthèses des assemblages en étoile	112
2.1.1. Utilisation d'oligonucléotides modifiés	112
2.1.2. Conditions d'hybridation	113
2.1.3. Assemblages utilisant des complexes de ruthénium mono-ODN	113
2.1.4. Assemblages utilisant des complexes de ruthénium bis-ODN	116
2.2. Caractérisations des assemblages en étoile	118
2.2.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	118
2.2.2. Température de dénaturation	122
2.2.3. Dichroïsme circulaire	123
2.2.4. Spectrophotométrie de luminescence.....	124
2.3. Conclusion sur les assemblages de forme étoile	125
3. Conclusions.....	125
Conclusion générale	127
Partie expérimentale	133

Abréviations

ABRÉVIATIONS

4WJ : 4-way junctions

A : adénine

ADN : acide désoxyribonucléique.

AFM : *atomic force microscopy*

bipy : bipyridine

C : cytosine

(CD₃)₂CO : acétone deutérée

CH₂Cl₂ : dichlorométhane

CHCl₃ : chloroforme (CDCl₃ solvant deutéré)

CH₃CN : acétonitrile (CD₃CN solvant deutéré)

CH₃OH : méthanol (CD₃OD solvant deutéré)

Cl₃CCCl₃ : hexachloroéthane

ClCOCOCl : chlorure d'oxalyle

CuAAC : Cycloaddition 1,3-dipolaire alcyne azoture catalysée au Cu (I)

DME : diméthoxyéthane

DMSO : diméthylsulfoxyde

DMT-MM : chlorure de 4-(4,6-bismethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholine

Duplex : double-brin d'ADN

DX : *double crossover*

eq. : équivalent

Et₃N : triéthylamine

Et₂O : éther diéthylique

EtOAc : acétate d'éthyle

EtOH : ethanol

G : guanine

H₂O : eau

HPLC : *high performance liquid chromatography*

KPF₆ : hexafluorophosphate de potassium

LDA : diisopropylamidure de lithium

m : multiplet

MALDI-TOF : *matrix-assisted laser desorption ionisation – time of flight*

MeOH : méthanol

MgCl₂ : chlorure de magnésium

MOPS : acide 3-morpholinopropane-1-sulfonique

N/A : non-attribué

Nal : iodure de sodium

NaN₃ : azoture de sodium

Na₂SO₄ : sulfate de sodium

NaCl : chlorure de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium, soude

NH₄OH : ammoniacque

ODN : Oligodésoxyribonucléotide ou oligonucléotide, court brin d'ADN

PAGE : *polyacrylamide gel electrophoresis* ; électrophorèse sur gel de polyacrylamide

PE : éther de pétrole

Ru : ruthénium

s : singulet

Sticky end : bouts collant. Brins d'ADN simple-brin qui dépassent d'un duplex et permettent une hybridation avec un autre brin d'une autre structure.

t : triplet

T : thymine

TA : température ambiante

TBTA : Tris((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amine

tBuOH : terbutanol

TEM : *transmission electronic microscopy* ; microscopie électronique à transmission

THF : tétrahydrofurane

THPTA : Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine

TMSCl : chlorure de triméthylsilane

T_m : *melting temperature* ; température de dénaturation

Tris : Tris(hydroxymethyl)aminomethane

TX : *triple crossover*

UPLC : *ultra performance liquid chromatography*

Introduction générale

Introduction générale

L'ADN, polymère issu du monde du vivant, possède une propriété d'auto-hybridation qui par la création de liaisons hydrogène lui permet de s'assembler en un double-brin. Le double-brin ainsi formé a une forme hélicoïdale et une géométrie particulière dont les paramètres sont aujourd'hui connus (Figure 1). Cette molécule biologique est donc – en dehors de l'aspect génétique – une formidable molécule d'assemblage. Associés à cette molécule, des complexes métalliques peuvent apporter leurs propriétés physiques et chimiques et ainsi former des structures supramoléculaires hybrides.

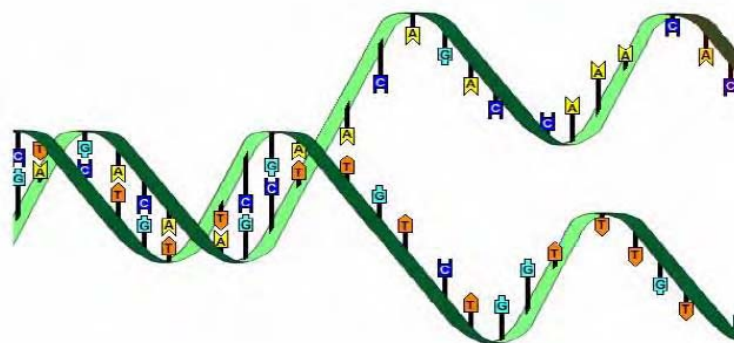


Figure 1 – Double-hélice d'ADN formée de deux brins complémentaires.

Le chapitre d'introduction montre comment des structures nucléiques complexes ont pu être obtenues. La synthèse automatisée de séquences nucléiques et l'ajout de molécules – organiques ou inorganiques – au sein même des séquences sont des points clés pour la formation de structures géométriquement définies. L'ADN permet de former des structures dont la précision et la définition vont aller grandissantes tout au long du chapitre, de simples duplex (double-brins) à des formes géométriques contrôlées.

Le chapitre suivant décrit la fonctionnalisation de complexes de ruthénium par des fonctions acide carboxylique, alcyne et azoture. L'utilisation d'oligonucléotides fonctionnalisés par des fonctions amine et alcyne permet la synthèse par amidation et *click chemistry* de molécules hybrides Complexe de ruthénium/ADN. La réaction d'amidation donne deux produits : un complexe de ruthénium lié à un seul ODN et un complexe lié à deux ODNs identiques. La réaction de *click chemistry* est plus spécifique et permet de former les deux molécules précédentes,

mais également un complexe de ruthénium lié à deux ODNs différents. La purification et la caractérisation des molécules ont été faites par utilisation de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE), et par spectrophotométries UV-visible et de luminescence. La spectrométrie de masse a permis enfin d'avoir une caractérisation supplémentaire de certaines de ces structures.

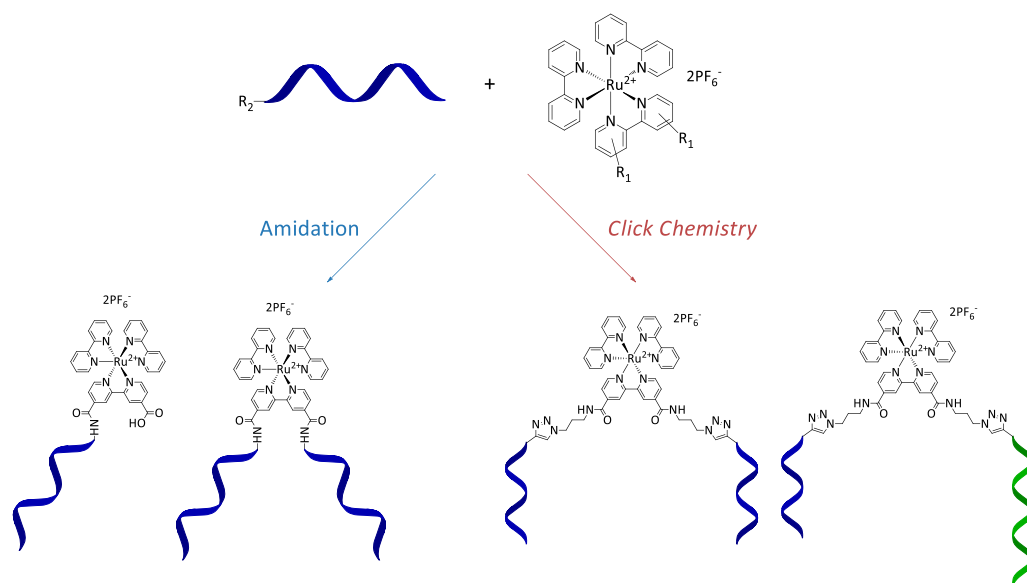


Figure 2 - Représentation schématique des synthèses de molécules hybrides ruthénium/ADN

Un troisième chapitre décrit l'assemblage de ces différentes molécules et les structures réalisées grâce à l'hybridation des séquences nucléiques (Figure 3). L'hybridation a permis de former des assemblages « linéaires » dans lesquels des complexes de ruthénium sont séparés par des duplex d'ADN. La longueur et la séquence des ODNs donnent sa spécificité au placement des complexes de ruthénium dans la structure. Cette méthodologie a permis d'aligner de 1 à 7 complexes de ruthénium sur une structure nucléique. D'autres assemblages en forme de double-étoiles ont été formés. La formation de jonctions à trois branches et l'utilisation de *sticky ends* sur cette structure ont permis de positionner des complexes de ruthénium sur sa périphérie. L'utilisation d'un complexe de ruthénium lié à deux séquences nucléiques a permis de lier deux de ces jonctions et de former une structure en double-étoile. Le positionnement de complexes de ruthénium sur la périphérie de cet assemblage a été possible grâce à la spécificité des *sticky ends*.

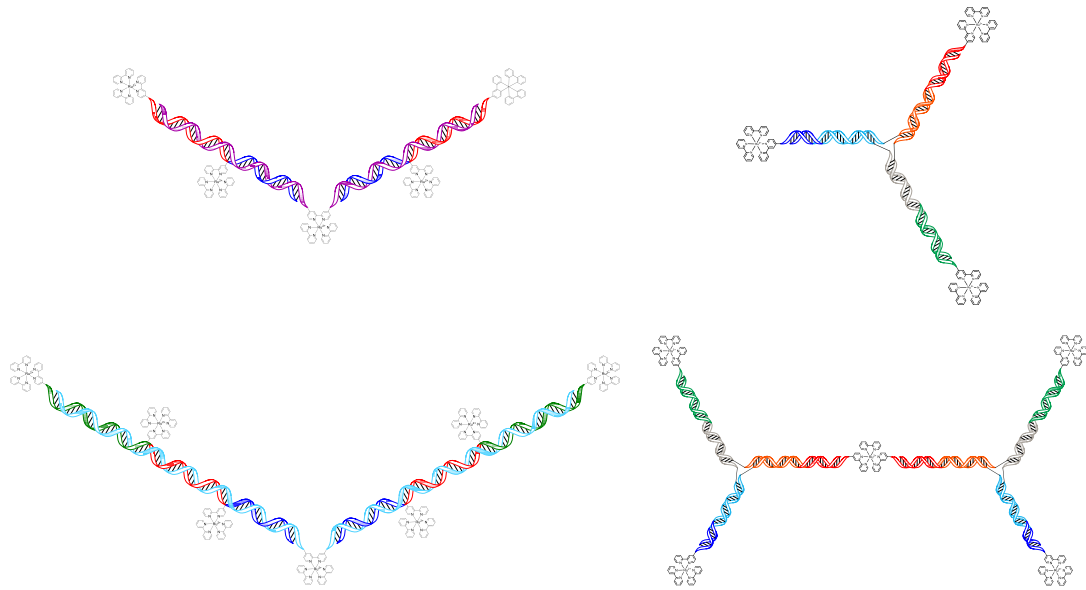


Figure 3 – Exemple de structures linéaires à 5 et 7 complexes de ruthénium et des structures simple et double-étoile.

Une conclusion sur ces travaux nous permettra de voir l'ensemble des structures formées. Les possibilités d'assemblages qui permettraient de former les molécules hybrides composées d'un complexe de ruthénium lié à un, deux ou plus de deux oligonucléotides seront abordées.

Chapitre 1

ADN et chimie supramoléculaire d'assemblage

Chapitre 1

ADN et chimie supramoléculaire

1. Introduction

1.1. Chimie supramoléculaire de structure

La chimie supramoléculaire a connu un développement très important au cours des cinquante dernières années et les progrès effectués en synthèse ont fait émerger quantité de domaines dont les buts et les méthodes sont sensiblement différents. Ces différents domaines qui ont émergé avaient un but commun : construire chimiquement des macromolécules de la manière la plus précise et la plus contrôlée possible. Les polymères sont un exemple parmi d'autres illustrant parfaitement la croissance d'une molécule : à partir d'une (ou plusieurs) entité(s) appelée(s) monomère(s), la répétition de celle(s)-ci conduit à une structuration contrôlée d'un ensemble moléculaire. Un autre exemple marquant est celui des dendrimères : par synthèse chimique, la croissance des molécules par ajout de dendrons à chaque génération est parfaitement contrôlée.

Il s'agit dans ce manuscrit de parler de chimie supramoléculaire. Il y est question de la construction de structures moléculaires à partir de molécules qui vont s'assembler entre elles grâce à une propriété bien particulière. L'auto-hybridation des brins d'ADN est au cœur de ces structures, mettant en jeu des liaisons hydrogène à la place de liaisons covalentes renforcées par l'empilement des bases (*π -stacking*).

1.2. ADN et structure

1.2.1. Généralités et considérations structurales

L'ADN est la molécule support de l'information génétique : il s'agit de la biomolécule la plus importante du monde du vivant, puisque l'information génétique est à la base du développement dans la biosphère. Cependant, ce qui nous intéresse ici est plus particulièrement – et sans regard quant à l'information génétique – la structure moléculaire des brins d'ADN. Cette molécule est composée de quatre motifs principaux. La guanine (G) et l'adénine (A) sont les bases puriques et la

cytosine (C) et la thymine (T) sont deux bases pyrimidiques. Ces quatre bases azotées sont reliées entre elles par le squelette sucre-phosphate sur lequel les bases sont liées en position 1' sur chaque sucre (Figure 1).

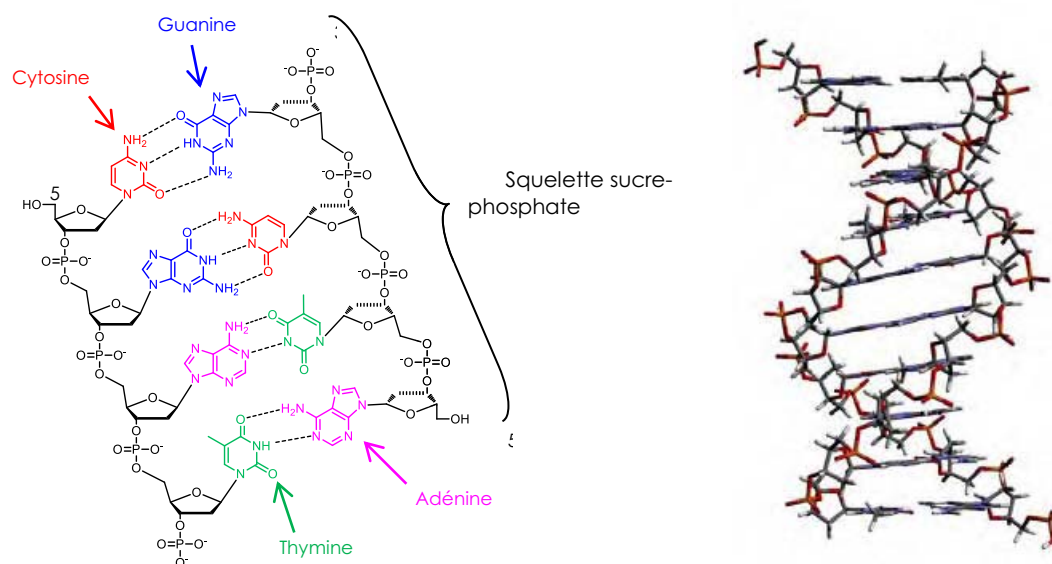


Figure 1 - Structure moléculaire de l'ADN. Liaisons hydrogène impliquées et formation de la double-hélice de type B.

La propriété qui nous intéresse est la capacité de cette molécule à s'hybrider à son complémentaire. En effet, les bases nucléiques peuvent se lier deux à deux par le biais de deux ou trois liaisons hydrogène. Comme le montre la Figure 1, la thymine et l'adénine forment deux liaisons hydrogène alors que la guanine et la cytosine en forment trois. Deux simples brins possédant des séquences complémentaires peuvent donc s'hybrider et former un double brin. Alors que le simple brin a une structure non définie, i.e. un brin structurellement non contraint, le double brin adopte lui une structure bien particulière. L'ADN biologique, une fois hybridé, se trouve généralement sous la forme d'une double hélice appelée hélice B. Cette hélice possède des paramètres structuraux aujourd'hui bien connus : un diamètre d'environ 2 nm, un tour de double hélice d'environ 10,5 paires de bases, soit environ 3.4 nm.¹ Dans la suite nous verrons que la connaissance des paramètres structuraux du double-brin d'ADN a permis des constructions élaborées et contrôlées.

Par ailleurs, une autre considération structurale est à prendre en compte : l'ADN a un « sens » de lecture. En effet, les sucres des bases sont reliés par les phosphates sur deux parties distinctes du désoxyribose en positions 3'- et 5'-. Par commodité,

les brins d'ADN sont souvent dessinés avec une flèche qui indique le sens 3'-vers-5' selon le squelette sucre-phosphate, convention que nous utiliserons dans ce manuscrit. En regard de l'hybridation, le sens est important : les brins s'hybrident dans des directions opposés (Figure 2).

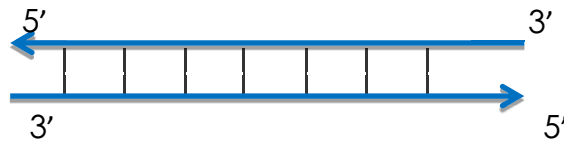


Figure 1 - Sens d'hybridation de deux simple-brins.

Enfin, une double hélice d'ADN est caractérisable par sa température de dénaturation (T_m), c'est-à-dire la température à laquelle l'énergie apportée au système est suffisante pour que les liaisons hydrogène et l'empilement des bases ne soient plus suffisants pour assurer la cohésion du double-brin, et permette ainsi la libération des deux simples brins. Cette propriété est importante pour la suite : les brins d'ADN peuvent s'hybrider et se déshybrider de manière contrôlée. Cette température est caractéristique de la longueur et de la séquence des brins, de l'énergie d'empilement des bases, mais également de la concentration des oligonucléotides, de la force ionique du milieu et de la présence de mésappariements possibles. La séquence est également importante : le couple C-G forme trois liaisons quand le couple A-T n'en forme que deux.

1.2.2. Synthèse automatisée d'oligonucléotides

La synthèse de cette molécule est un critère important. En effet, afin de former des structures à grande échelle moléculaire, les quantités de molécules nécessaires deviennent assez limitantes. La synthèse sur support solide développée ces dernières années a permis d'obtenir des oligonucléotides (ODN) avec une bonne reproductibilité par le biais d'une synthèse automatisée. L'automatisation de la synthèse a permis une production industrielle de cette molécule. Cette automatisation a cependant ses limitations : plus la longueur d'oligonucléotide souhaitée est importante, plus le rendement global chute. En effet, la synthèse fait intervenir à chaque ajout des bases nucléiques protégées qui nécessitent plusieurs étapes de synthèse. A chaque ajout de base donc, des oligonucléotides secondaires incomplets affectant le rendement global sont produits.

1.2.3. *Sticky ends (ou bouts collants) et ligases*

On appelle *sticky ends* (bouts collants en français), des oligonucléotides simple-brin qui dépassent d'un double-brin en 5'. La technique consiste donc à hybrider deux duplex de longueurs différentes, le plus court étant complémentaire avec une partie du plus long, laissant libre une partie de l'oligonucléotide en dehors du double brin (Figure 3). Cette technique permet d'attacher un autre brin complémentaire du sticky end au double-brin précédemment formé. Le développement de cette méthodologie a permis d'imaginer comme nous allons le voir par la suite des sous-structures s'attachant entre elles par le biais de *sticky ends* complémentaires.

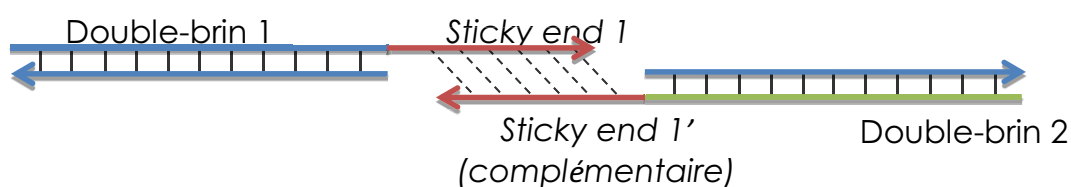


Figure 3 - Principe d'accrochage de deux double-brins par l'utilisation de *sticky ends*.

Un autre point important est l'utilisation de ligases. Beaucoup moins utilisées que les *sticky ends*, l'utilisation de ces enzymes n'en reste pas moins très intéressante. En effet, deux bases nucléiques proches mais non liées entre elles peuvent avoir leurs parties sucre-phosphate liées par l'action d'une ligase lorsqu'elles sont engagées dans un double-brin. Cette enzyme issue du monde biologique relie les deux bases par leur squelette sucre-phosphate entre la partie 5'-phosphate d'un ODN et la partie 3'-OH d'un ODN voisin permettant ainsi de ne plus former qu'un seul oligonucléotide.

Ces propriétés et techniques développées autour de la molécule d'ADN ont permis d'imaginer la structuration d'édifices à base de ce polymère biologique. Dans la suite du manuscrit, nous allons voir comment, dans quels buts et par quelles méthodes les chercheurs ont bâti ces structures.

2. Assemblages à base d'ADN : utilisation de l'association de brins complémentaires

2.1. Deux structures de départ importantes

Certaines structures phares ont permis la construction d'édifices moléculaires basées sur l'hybridation des bases nucléiques. Ces structures ont des formes particulières et permettent une structuration dans l'espace d'assemblages distincts. Les deux structures principales de départ qui ont été développées en premier lieu sont les *4-way junctions* (« jonctions à quatre directions ») et les *double cross-overs* ou DX (« double entrelacement »).

2.2. Four-way junctions (4WJ)

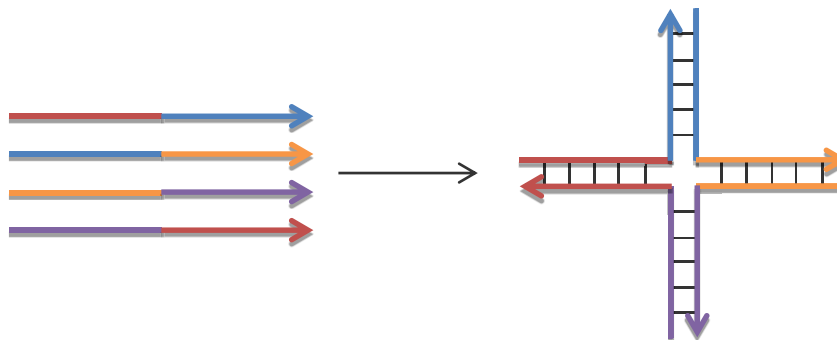


Figure 2 - Formation des *four-way junctions*.

Les 4WJ ont été utilisées en premier lieu par Nadrian Seeman et sont inspirées de la *Holliday Junction* (du nom de Robin Holliday qui proposa la structure en 1964)² : il s'agit de quatre brins hybridés chacun avec une partie de deux autres brins (Figure 4). En utilisant quatre brins soigneusement choisis, on obtient une structure en croix constituée de double-hélices nucléiques. N. Seeman proposa une approche théorique de la structure.³ Il montre dans ses travaux que ces jonctions peuvent être élaborées de manière à ce que les erreurs d'hybridation soient les plus limitées possibles et que la structure soit la plus stable possible. Un algorithme permettant de choisir les séquences est même proposé.⁴ Ces structures vont servir d'éléments de construction ; l'utilisation de *sticky ends* permettra de les relier entre elles et leur croissance aboutira à des réseaux à deux ou trois dimensions.

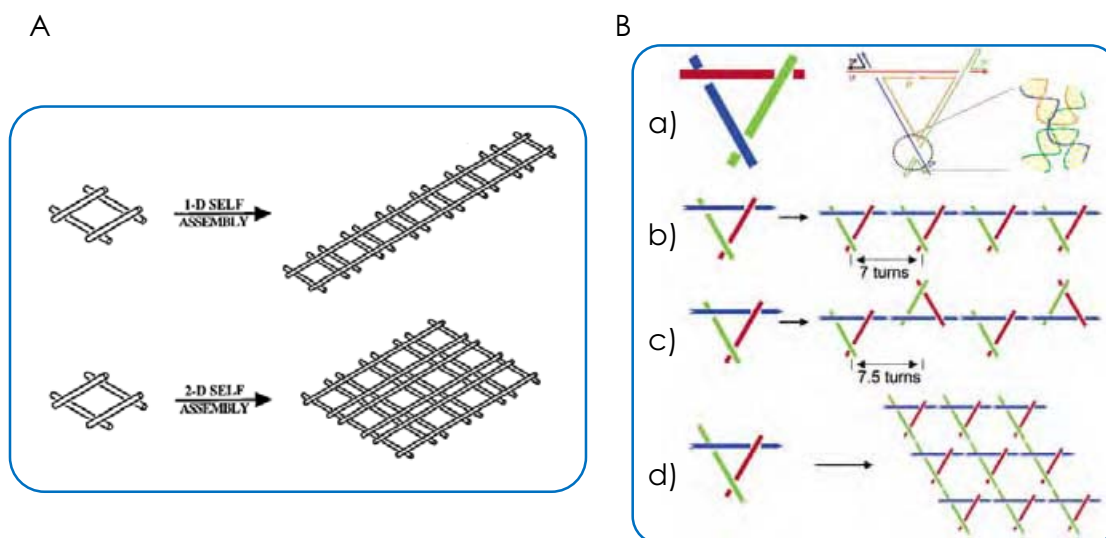


Figure 5 – A – Auto-assemblage de la brique carrée constituée de 4 4-way junctions sur 1 ou 2 dimensions.⁵ – B – Auto-assemblage d'une brique triangulaire constituée de 4WJ également sur 1 et 2 dimensions.⁶

En se basant sur la connectivité des *sticky ends*, Seeman montre la construction de structures d'assemblage carrées : à chaque angle du carré se trouve une 4WJ (Figure 5 A).⁵ Le jeu de *sticky ends* employés permet de choisir le sens de la croissance de la structure. Avec des *sticky ends* sur deux côtés, la structure croît de façon linéaire, alors qu'en les positionnant sur quatre côtés, la croissance se fait sur deux dimensions (Figure 5 A). L'ajout de motifs attachés ensemble par des *sticky ends* présente cependant un problème : la taille de la structure ne peut être contrôlée.

L'équipe de C. Mao a plus récemment travaillé des structures triangulaires formées à base de 4WJ (Figure 5 B a).⁶ Chaque angle du triangle est constitué d'une 4WJ desquelles dépassent des *sticky ends* qui vont permettre comme dans le cas précédent de former des assemblages modulables en fonction du nombre de tours du double-brin. La croissance peut se faire sur une dimension avec un seul *sticky end* comme sur deux dimensions en utilisant des *sticky ends* sur chaque angle du triangle de base (Figure 5 B b, c, d).

L'obtention de structures distinctes dans l'espace montre clairement que les 4-way junctions sont des structures de base modulables pour former des assemblages nucléiques à l'aide de *sticky ends*.

2.3. Double cross-over ou DX

La deuxième structure utilisée pour former des assemblages nucléiques est plus stable et plus rigide que la *four-way junction*. La structure est appelée DX pour *double cross-over*. Cette structure de base a été imaginée par N. Seeman qui l'a construite par entrecroisement de différents oligonucléotides sur plusieurs double-brins (Figure 6 A).⁷ Les assemblages de départ de cette structure ont été faits à partir de deux double-brins dont les séquences ont été choisies de telle sorte que les oligonucléotides s'assemblent alternativement sur un premier double-brin puis sur un autre adjacent. Plusieurs possibilités émergent de cette méthodologie que montre la Figure 6. À partir de ces structures primaires, Seeman a assemblé une structure plus évoluée par alternance de ces deux structures DX (Figure 6 B).⁸

Une évolution de cette structuration moléculaire a été faite plus récemment par l'équipe de C. Mao. Le fait de n'utiliser que deux brins symétriques au lieu de quatre différents permet de limiter les erreurs d'hybridation puisque la spécificité de l'hybridation augmente.⁹ Les structures obtenues sont cependant similaires, la brique de base employée étant similaire.

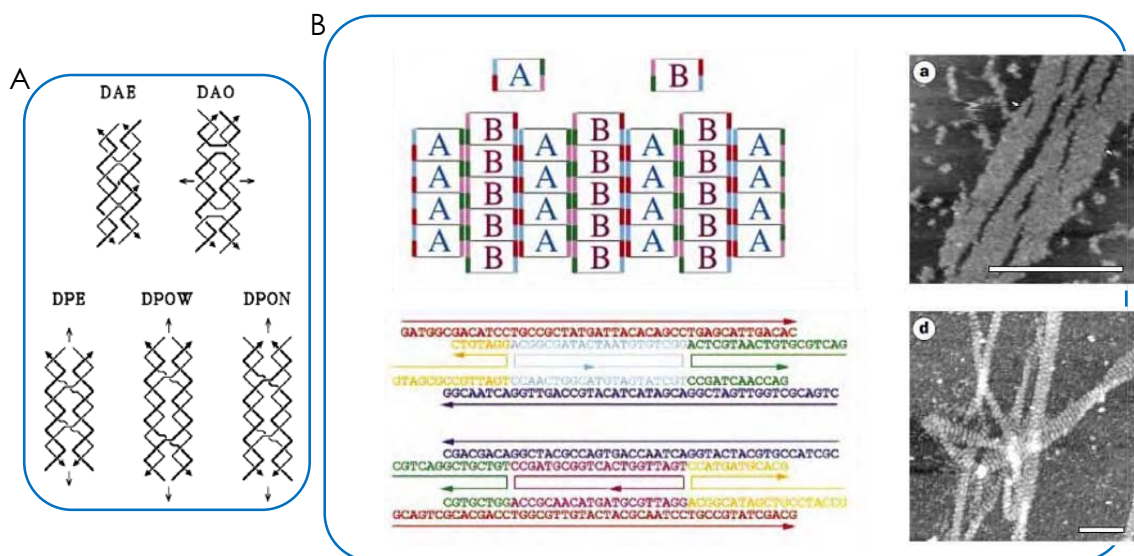


Figure 6 – A – Les cinq différentes structures schématiques proposées par Seeman pour les DX.⁷ B – Structuration séquentielle de deux structures DX par utilisation de *sticky ends* et visualisation AFM des assemblages obtenus (barre de mesure = 300 nm, image d obtenue avec immobilisation de protéines sur la structure).⁸

2.4. DX et 4-way junctions

Les structures DX permettent d'apporter la robustesse : la spécificité de l'hybridation et le croisement de deux double-hélices conduit à une structure définie et unique. Les 4WJ apportent quant à elles une structure qui part dans quatre directions au lieu de deux comme c'est le cas pour les DX. La combinaison des deux structures conduit donc à une structure à quatre directions, donc chaque direction est formée de deux double-hélices imbriquées (Figure 7).

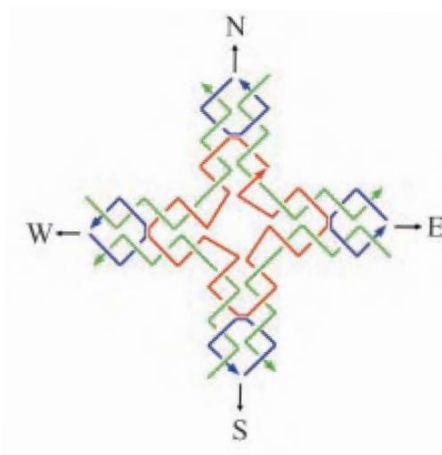


Figure 7 - 4-way junction à base de double-hélices imbriquées (DX).¹⁰

L'utilisation de *sticky ends* permet d'assembler ces structures de base afin de former des réseaux – définis ou non – formés d'oligonucléotides. T. H. LaBean et son équipe ont construit des réseaux 2D à partir de cette structure (Figure 8).¹⁰ Le jeu de *sticky ends* employés permet de jouer sur l'orientation et le sens d'assemblage des briques entre elles (Figure 8 A & B). Ainsi les jonctions s'imbriquent dans le sens défini par l'expérimentateur.

Sur la même base structurale, l'équipe de C. Mao a apporté un élément en plus : la symétrie.¹¹ Au lieu d'utiliser neuf oligonucléotides différents pour former la jonction, l'équipe n'en utilise plus que trois (Figure 8 C), induisant une symétrie au sein de la structure limitant les erreurs d'hybridation. Ils obtiennent ainsi un maillage atteignant le millimètre avec une structure très régulière comme le montre l'image AFM (Figure 8 C).

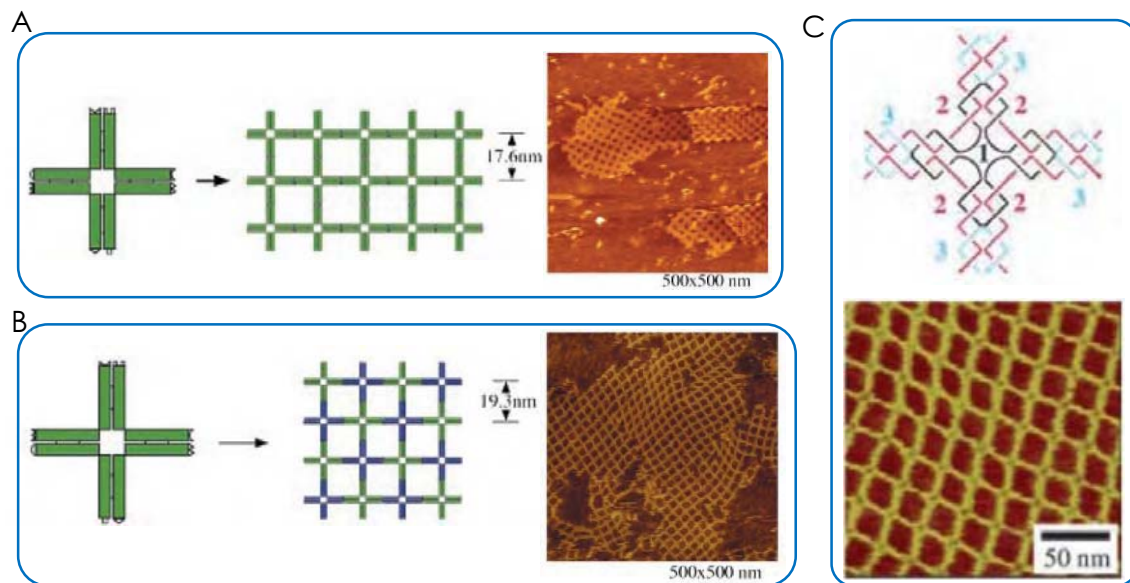


Figure 8 – Assemblage de briques mixtes DX / 4WJ. A) Assemblage des briques dans le même sens et visualisation AFM.¹⁰ B) Assemblage des briques haut/bas et visualisation AFM.¹⁰ C) Assemblage d'une jonction mixte DX/4WJ à partir de 3 brins uniques et visualisation AFM de l'association de ces structures.¹¹

Afin d'obtenir des maillages définis en termes de taille, un choix judicieux des *sticky ends* permet de définir une structuration précise (Figure 9). L'utilisation d'un nombre limité de *sticky ends* distincts donne à la structure une spécificité nouvelle comme le montre les travaux de H. Yan et al.¹² L'assemblage d'un carré de 5 jonctions de côté est ainsi obtenu (Figure 9 A).

L'utilisation de deux jonctions et la structuration séquencée de celles-ci a permis à T. LaBean et son équipe de former un assemblage similaire mais avec seulement deux jonctions différentes au lieu de sept (Figure 9 B).¹³ Cette méthodologie leur permet de former des lettres en immobilisant au centre de leurs jonctions des protéines, ce qui leur permet d'obtenir les lettres D, N et A.

L'utilisation combinée de ces deux méthodes (4WJ & DX) montre la possibilité de construire des réseaux moléculaires ainsi que des structures stables et finies par l'utilisation de *sticky ends* distincts. Un assemblage séquentiel de ces jonctions a permis de former des structures définies dans l'espace, visualisées en AFM.

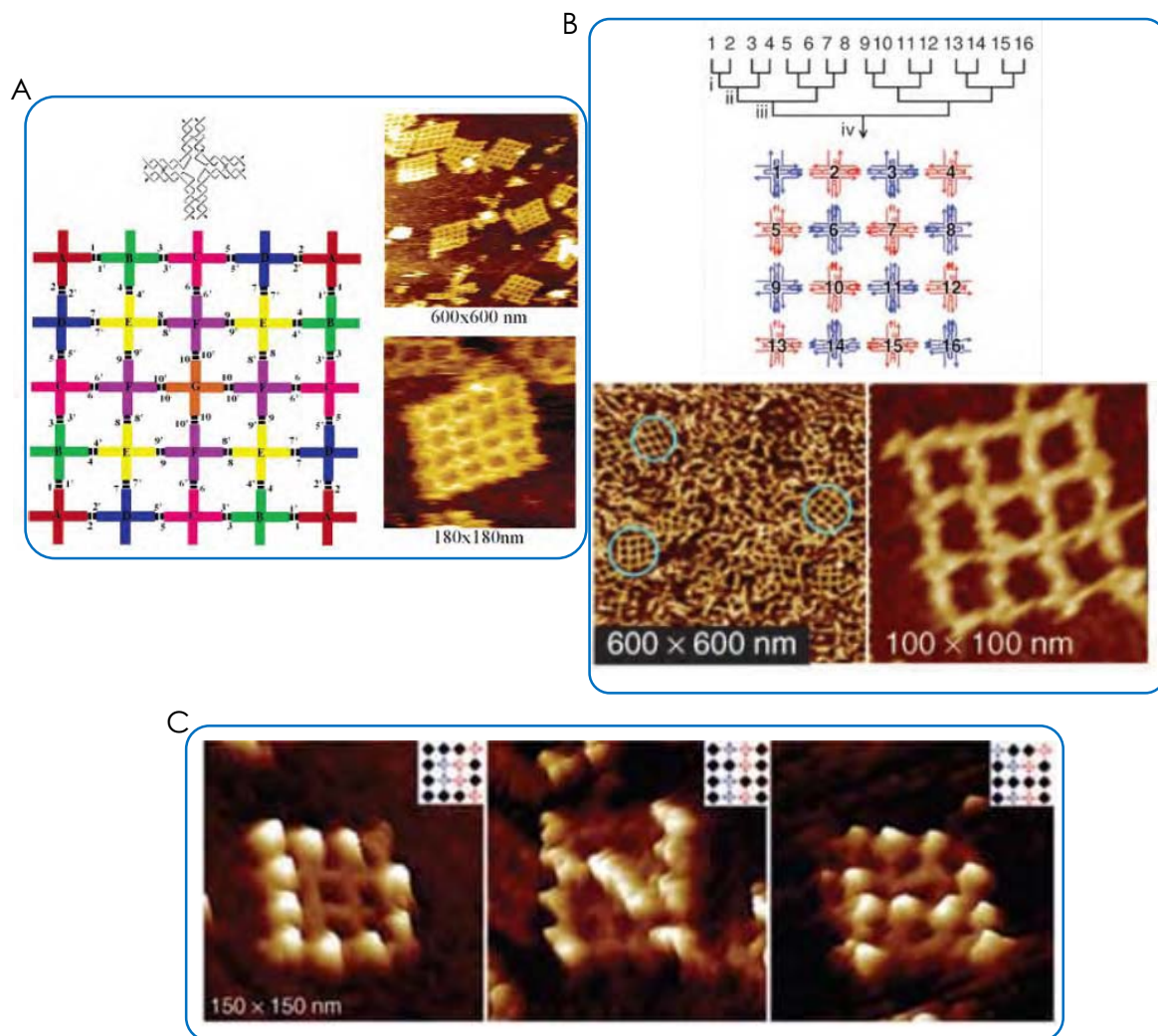


Figure 9 – A – Formation d'un assemblage carré 5x5 à partir de 7 sept jonctions uniques.¹²
 B - Assemblage d'un carré 4x4 à partir de 2 jonctions uniques par assemblage séquentiel.¹³
 C – Formation de lettres sur les assemblages 4x4 obtenus par immobilisation de protéines.¹³

2.5. Extension de ces méthodes

2.5.1. Extension des structures DX à plus de deux double-hélices

Une extension des méthodologies abordées jusqu'à présent concerne les structures DX (Figure 11). Jusqu'à présent, ces structures ne se composaient que de l'entrecroisement de deux duplex (double-brin), mais ce nombre n'est pas une limitation. N. Seeman et T. LaBean ont mis au point une structure *triple cross-over*

ou TX qui est le chevauchement de quatre oligonucléotides sur trois duplex.¹⁴ L'assemblage de ces structures forme un réseau 2D régulier visualisé en AFM (Figure 10 A).

En 2005, T. LaBean a montré une structure formée de trois duplex dans laquelle chaque double-brin est relié aux deux autres par des jonctions DX.¹⁵ La spécificité des *sticky ends* permet d'obtenir des filaments de ces trois duplex qui s'alignent (3 *sticky ends* à chaque extrémité, non représenté sur la Figure 10) ou alors des réseaux 2D avec seulement deux *sticky ends* aux extrémités (*sticky ends* d, d', e et e' sur la schéma de la Figure 10 B).

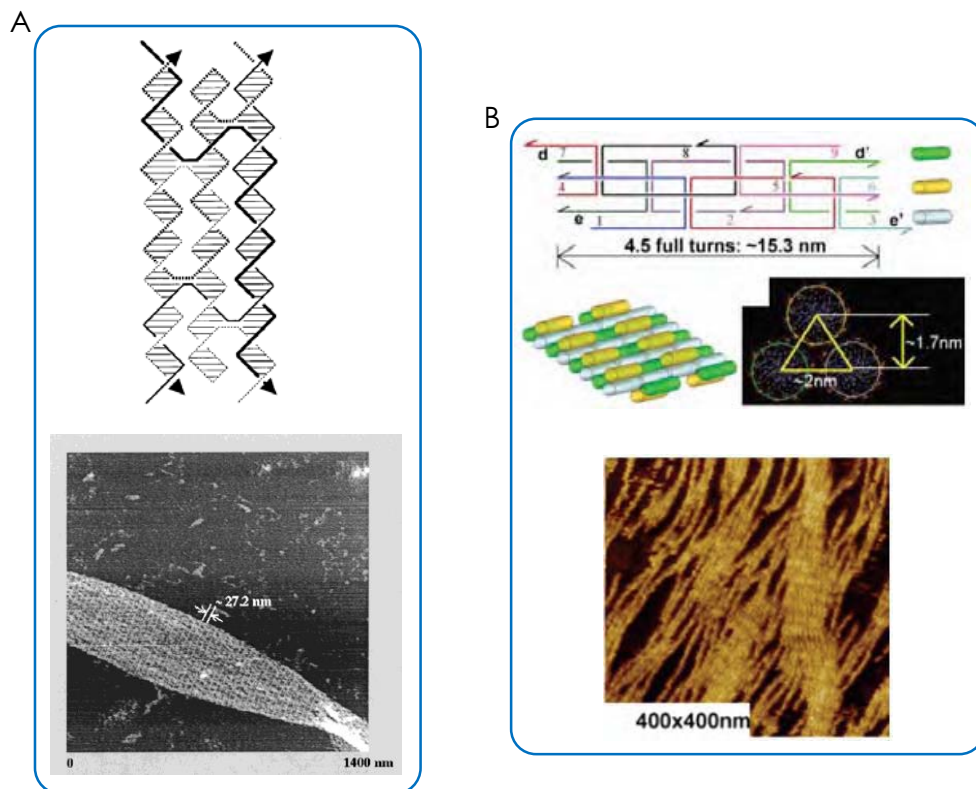


Figure 10 – A – Structure de la brique d'assemblage *triple cross-over* et image AFM de l'assemblage de deux d'entre elles.¹⁴ B – Assemblages 2D à base de structures DX formées de 3 double-hélices liées entre elles par 2 *sticky ends* et image AFM correspondante.¹⁵

Le nombre de duplex impliqués dans cette structure a été augmenté à 4 par D. Reishus et al. (Figure 11 A).¹⁶ L'assemblage sous forme hexagonale de cette structure permet de former des réseaux 2D de motif de répétition de forme hexagonale. Selon la concentration des oligonucléotides lors de l'hybridation, l'assemblage peut également se faire sous forme de filament (images AFM Figure 11 A).

Dans la même optique d'utilisation de la jonction DX avec plus de deux duplex, Y. Liu et al. ont utilisé des briques carrées formées de huit duplex liés entre eux par des jonctions DX.¹² L'utilisation de *sticky ends* uniquement aux quatre angles de la structure ainsi que celle de treize structures uniques leur permet de former un assemblage centrosymétrique fini de 5x5 structures, visualisé en AFM (Figure 11 B).

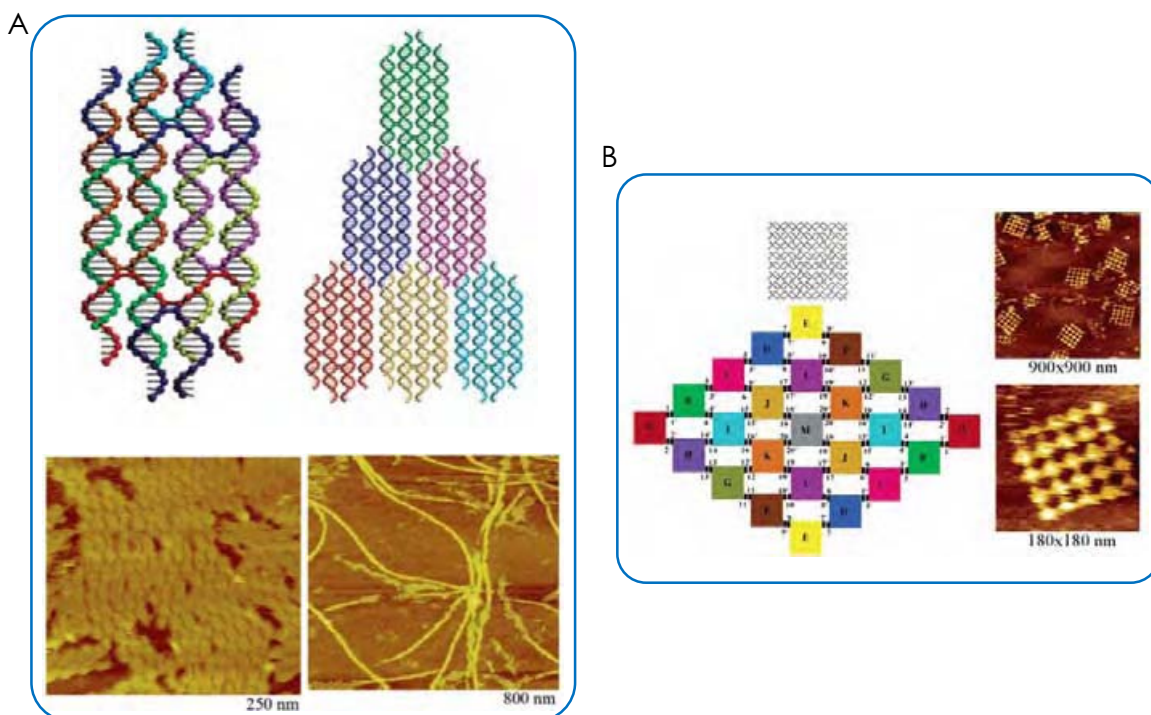


Figure 11 – A – Brique DDX (*double-double cross-over*) de forme hexagonale, assemblage de plusieurs d'entre elle et visualisations AFM correspondantes.¹⁶ B – Formation de réseaux 2D de taille et morphologie finies à partir d'une structure DX reliant huit duplex d'ADN.¹²

Les structures à base de structures DX augmentées obtenues sont originales, mais restent cependant conceptuellement similaires aux structures vues précédemment. La formation des structures de base permet cependant d'entrevoir de nombreuses possibilités quant aux assemblages pouvant être obtenus.

2.5.2. Formation de nanotubes à base de jonctions DX

Utilisant cette même méthodologie de formation de structures, l'équipe a continué ses travaux afin de former des réseaux 2D sur la même base structurale, à savoir des assemblages de duplex liés par des jonctions DX de 4, 8 ou 12 duplex.¹⁷ Cependant, en jouant sur les *sticky ends* de la structure, ils ont obtenu un enroulement de la structure sur elle-même qui forme un nanotube formé exclusivement d'oligonucléotides (Figure 12 A). Cet enroulement peut se faire sur deux angles et

donner une torsion différente. Ces travaux ne sont cependant pas les premiers à montrer la formation de nanotubes à base d'oligonucléotides. N. Seeman avait déjà formé des nanotubes à bases de structures DX sur 6 duplex adjacents dont les deux parties latérales sont jointes par des *sticky ends*.¹⁸ Ce même type de structure est employé par l'équipe dans d'autres travaux dans lesquels ils forment le tube constitué de six duplex à l'aide de deux structures de chacune trois duplex (Figure 12 B).¹⁹ L'emploi de seulement une des deux parties donne naissance à des filaments, mais l'adjonction de la deuxième partie donne clairement naissance à des nanotubes uniformes qui s'assemblent sur une longue distance.

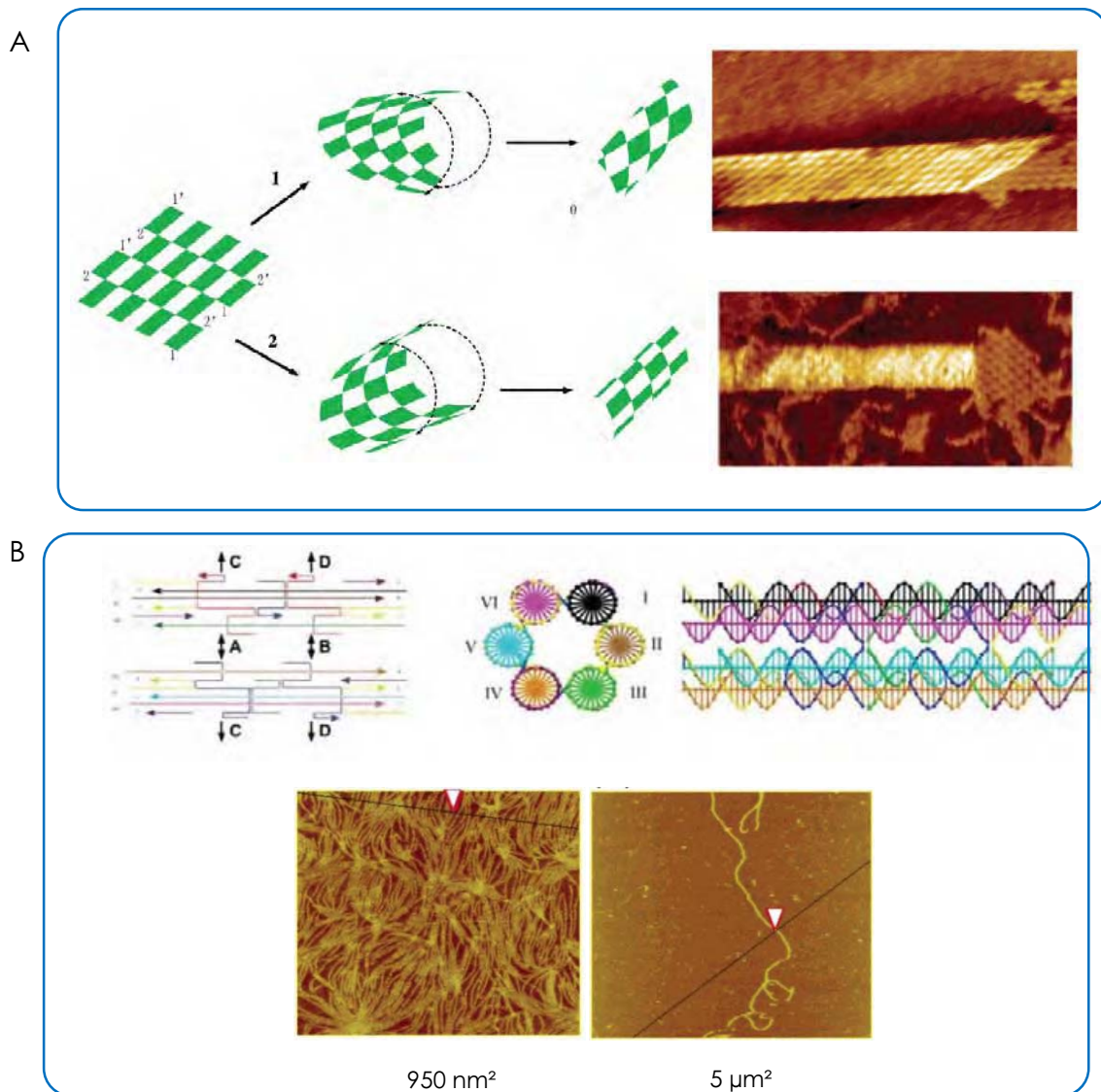


Figure 12 – A – Formation de nanotubes à partir de structures DX¹⁷. B – Assemblages de nanotubes formés de six double-hélices à partir de deux briques de trois double-hélices qui s'hybrident à l'aide de *sticky ends* latéraux et visualisation AFM¹⁹.

La formation de nanotubes par utilisation de jonctions DX a cependant aussi été envisagée de manière plus simple : le jonction DX n'ayant en commun que la moitié des *sticky ends* permet de les assembler en quinconce. Ainsi, l'équipe de J. Turberfield a pu assembler ces jonctions sous forme de réseaux bidimensionnels (Figure 13 B).²⁰ Dans des concentrations salines plus basses, ces réseaux plan s'enroulent et forment deux types de nanotubes : des nanotubes qui s'enroulent en face à face (Figure 13 C, image D) ou bien de manière hélicoïdale (Figure 13 D, image E). La forme générale de l'assemblage est montrée par la fixation de protéines sur les extrémités 5' des brins visualisées par microscopie TEM.

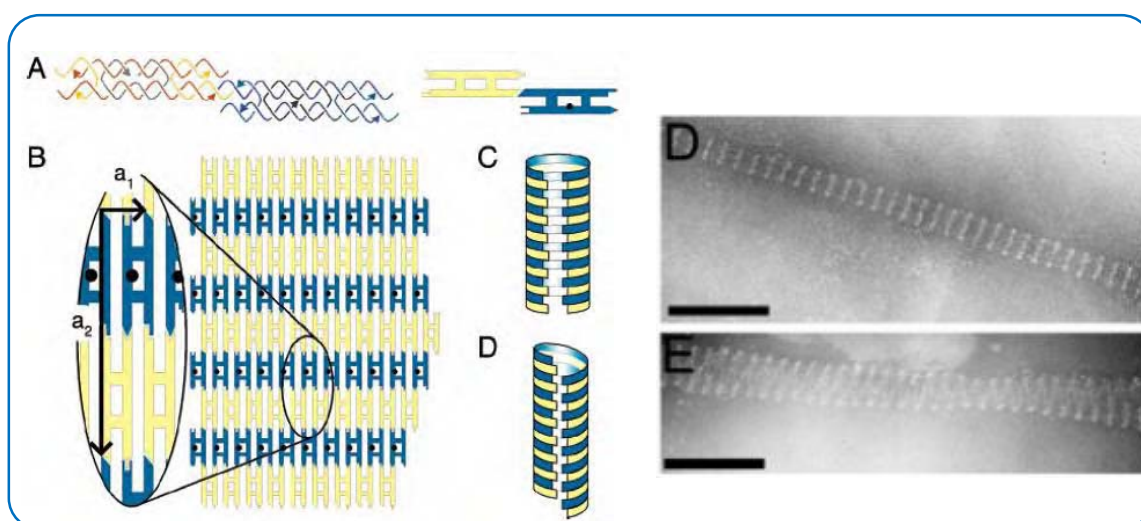


Figure 13 – Assemblage de DX en quinconce : schéma de leur liaison (A) ; formation de réseaux 2D (B), de nanotubes (C, D) et imagerie TEM de ces nanotubes (images D et E, barre = 200 nm).²⁰

L'utilisation d'un seul brin avec quatre parties palindromiques – parties qui se lisent dans les deux sens et qui donc peuvent s'auto-hybrider – a permis à C. Mao et son équipe d'imaginer une structure similaire à une jonction DX.²¹ Le brin s'auto-hybride sur deux duplex et laisse libre chaque extrémité créant ainsi des *sticky ends* en bouts de brins. Cette structure s'assemble pour former un nanotube, mis en évidence en AFM.

2.5.3. Formation d'un maillage hexagonal

Les structures DX ont été utilisées dans le cadre de la formation de structures différentes. N. Seeman l'a utilisé comme renfort de structure afin de former un maillage « pseudo-hexagonal » (Figure 14 A).²² Une structure nucléique en forme de triangle est doublée par l'utilisation de jonctions DX formant un motif composé de deux triangles attachés l'un sur l'autre. Les *sticky ends* présents en fin à chaque

angle du triangle permettent d'assembler ces structures, formant un maillage 2D avec un motif de répétition « pseudo-hexagonal », puisque la structure présente des hexagones liés par de petits triangles.

Un maillage hexagonal a été élaboré par C. Mao avec cependant une structure de départ différente.²³ Celle-ci est appelée *three-point-star motif*, qui consiste en une étoile à trois branches constituée de 7 ODNs différents symétriques (Figure 14 B). Les *sticky ends* en bouts de branches permettent de les associer sous forme d'hexagones adjacents et l'assemblage 2D obtenu est de grande taille (> 5 μm).

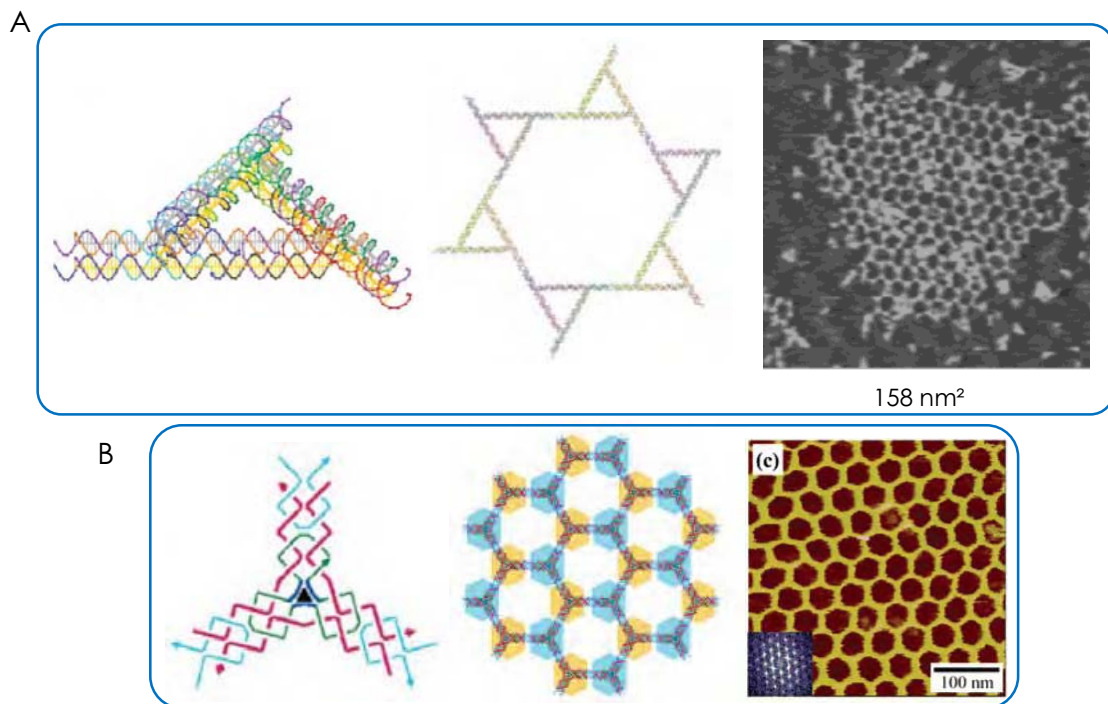


Figure 14 – A – Formation d'un réseau hexagonal à base de triangle de DX et image AFM correspondante.²² B – Formation d'un réseau 2D hexagonal à base de motifs *three-point star* et image AFM correspondante.²³

Le *three-point-star motif* a également permis à l'équipe de former des structures finies dans l'espace (Figure 15).²⁴ L'utilisation de plusieurs de ces motifs permet d'obtenir des structures géométriques parfaitement contrôlées. Plusieurs polyèdres sont formés : un tétraèdre, un dodécaèdre et une *buckyball*, structure alternant faces à cinq et faces à six côtés.

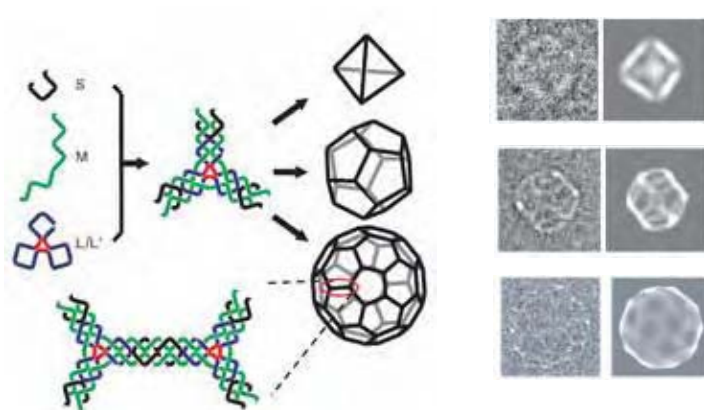


Figure 15 - Assemblages de *three-point-star* motives en 3 polyèdres tridimensionnels définis et imagerie cryo-TEM des assemblages obtenus.²⁴

Les structures de bases DX et 4WJ peuvent être étendues vers des structures plus complexes. Ces structures serviront alors à mettre en place des assemblages dont la morphologie est mieux contrôlée. Cependant, cette amélioration de la morphologie se fait au détriment de la modularité intrinsèque du duplex.

2.6. Structuration à partir du simple duplex

La formation de duplex peut être à la base de la formation d'assemblages. En effet, il n'est pas nécessaire de passer par la formation de structures primaires pour atteindre une structure secondaire plus importante. La formation de duplex d'ADN s'est révélée être tout aussi efficace dans de nombreuses méthodes originales d'assemblages moléculaires.

2.6.1. Origami

Le positionnement d'oligonucléotides est le cœur même de la méthode consistant à former des assemblages appelée origami. P. Rothemund donne ce nom aux assemblages qu'il crée par ressemblance avec les pliages de papier japonais (Figure 16).²⁵ Cependant, Shih et al avaient déjà mis au point une première structure se basant sur cette méthodologie.²⁶ L'octaèdre qu'ils ont formé est constitué d'un seul long oligonucléotide (1669 nucléotides) dont la séquence très spécifique a été choisie afin de se replier sur elle-même de manière définie. Comme l'on peut le voir sur la Figure 16 A, l'ODN est dessiné afin de former un pliage qui va, par hybridation, former l'octaèdre.

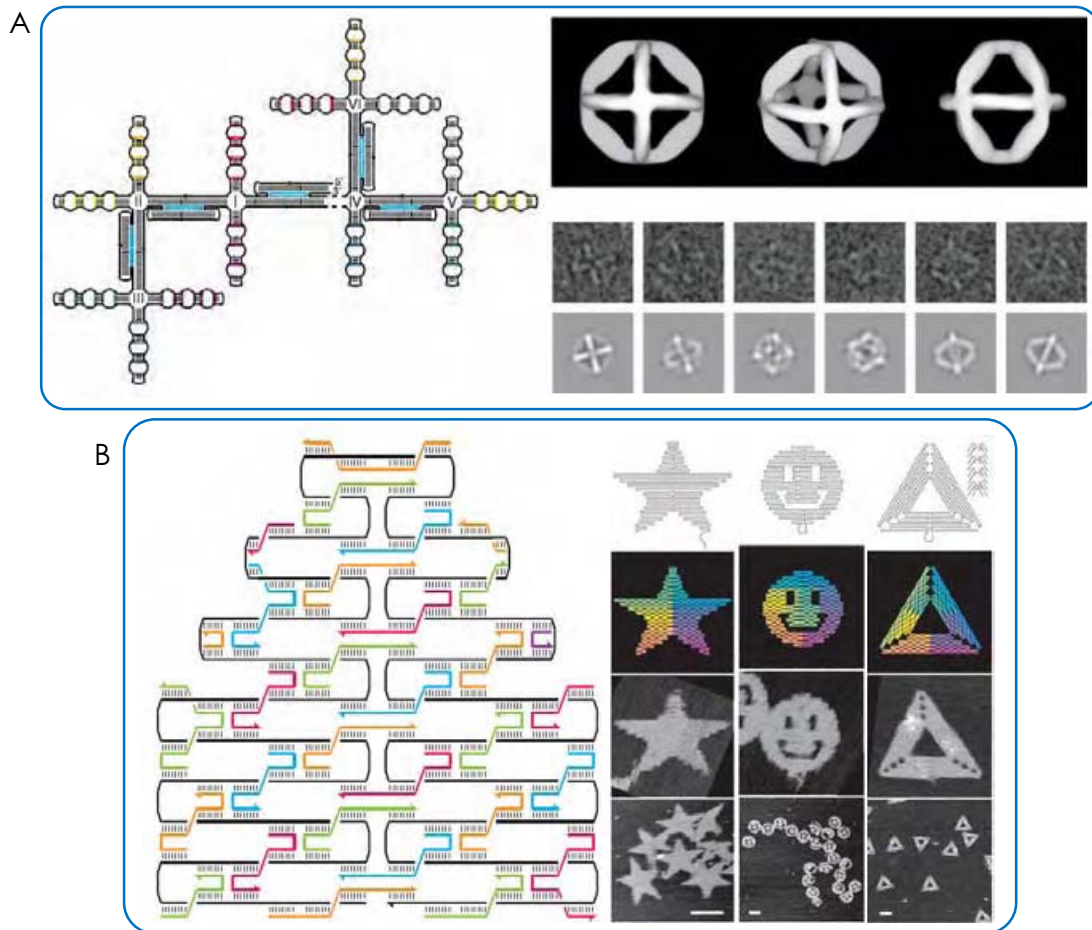


Figure 16 – A – Formation d'un octaèdre à partir d'un seul long brin hybridé sur lui-même, imagerie 3D de la structure et images TEM.²⁶ B – Assemblages par la méthode « Origami » d'oligonucléotides en des formes distinctes.²⁵

La technique que P. Rothmund emploie est un peu différente. En effet, il a utilisé un long ODN et d'autres séquences nucléiques beaucoup plus courtes qui vont contraindre la structure par la formation de duplex.²⁵ Les structures sur deux dimensions sont obtenues précisément, avec une bonne reproductibilité (Figure 16 B).

Cette méthodologie d'assemblage « Origami » a depuis évolué. M. Endo et al. ont formé des assemblages à la manière des puzzles (Figure 17 A).²⁷ Des assemblages rectangulaires sont formés à l'aide de duplex et maintenus par l'entrecroisement de plus courts brins. Cette structure possède une excroissance et un trou qui vont pouvoir s'assembler. Les structures sont obtenues par l'emboîtement de ces rectangles comme le montrent les images AFM de la structure (Figure 17 A).

L'origami d'ODNs est passé récemment à trois dimensions (Figure 17 B).²⁸ À partir d'assemblages similaires à ceux de P. Rothmund et en choisissant avec précision le nombre de bases nucléiques, D. Han et al. ont intégré la troisième dimension

dans les origamis. La connaissance de l'angle obtenu par le duplex permet d'obtenir plusieurs structures 3D (Figure 17 B).

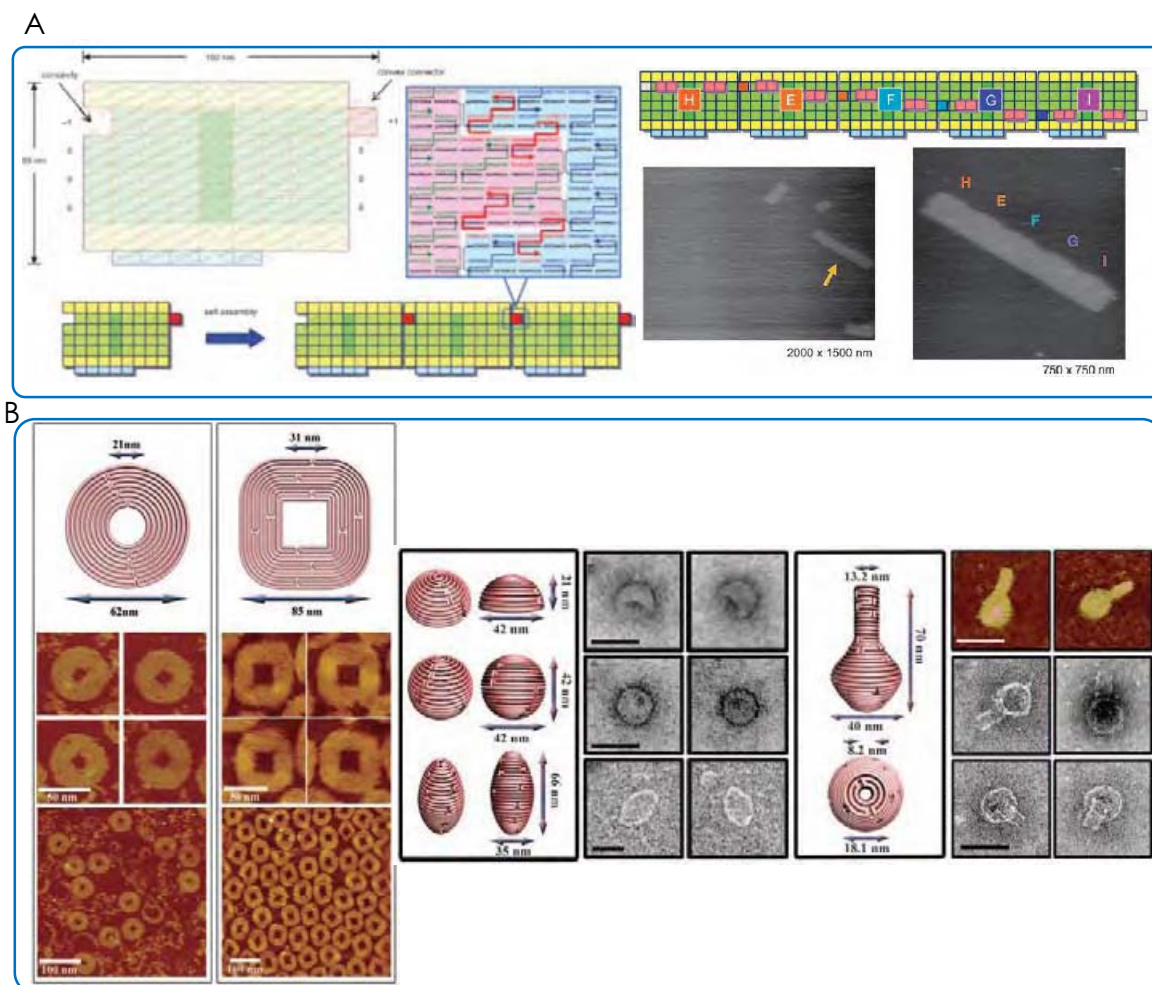


Figure 17 – A – Assemblages à la manière d'un puzzle formé par origami et images AFM validant la méthodologie.²⁷ B – Origamis à trois dimensions et images TEM structures.²⁸

2.6.2. Structuration de polymères

L'ADN est un polymère, les quatre nucléotides le constituant en étant les monomères. La synthèse automatisée a permis d'imiter le monde biologique en formant les ODNs à façon. Grâce à cette synthèse, Lazergues et al. ont imaginé des polymères di-blocs, chaque bloc étant formé d'un court enchainement de bases nucléiques (Figure 18 A).²⁹ Deux ODNs di-blocs sont construits et assemblés par hybridation des séquences. La formation de ces structures est suivie par la réponse en fréquence du quartz à l'aide d'une microbalance à quartz (QCM). La même méthodologie est employée pour former des assemblages à base de tri-blocs.

Avec une idée similaire, S. Waybright et al. forment un ensemble polymérique avec des ODNs (Figure 18 B).³⁰ Celui-ci est formé autour de deux molécules centrales, liées à deux ODNs par synthèse. Plusieurs de ces structures sont formées avec des ODNs complémentaires : les structures s'hybrident entre elles et forment un polymère linéaire. L'utilisation de la synthèse automatisée avec ou sans ajout de molécules tierces montre que les séquences nucléiques peuvent constituer un outil puissant dans la formation de polymères.

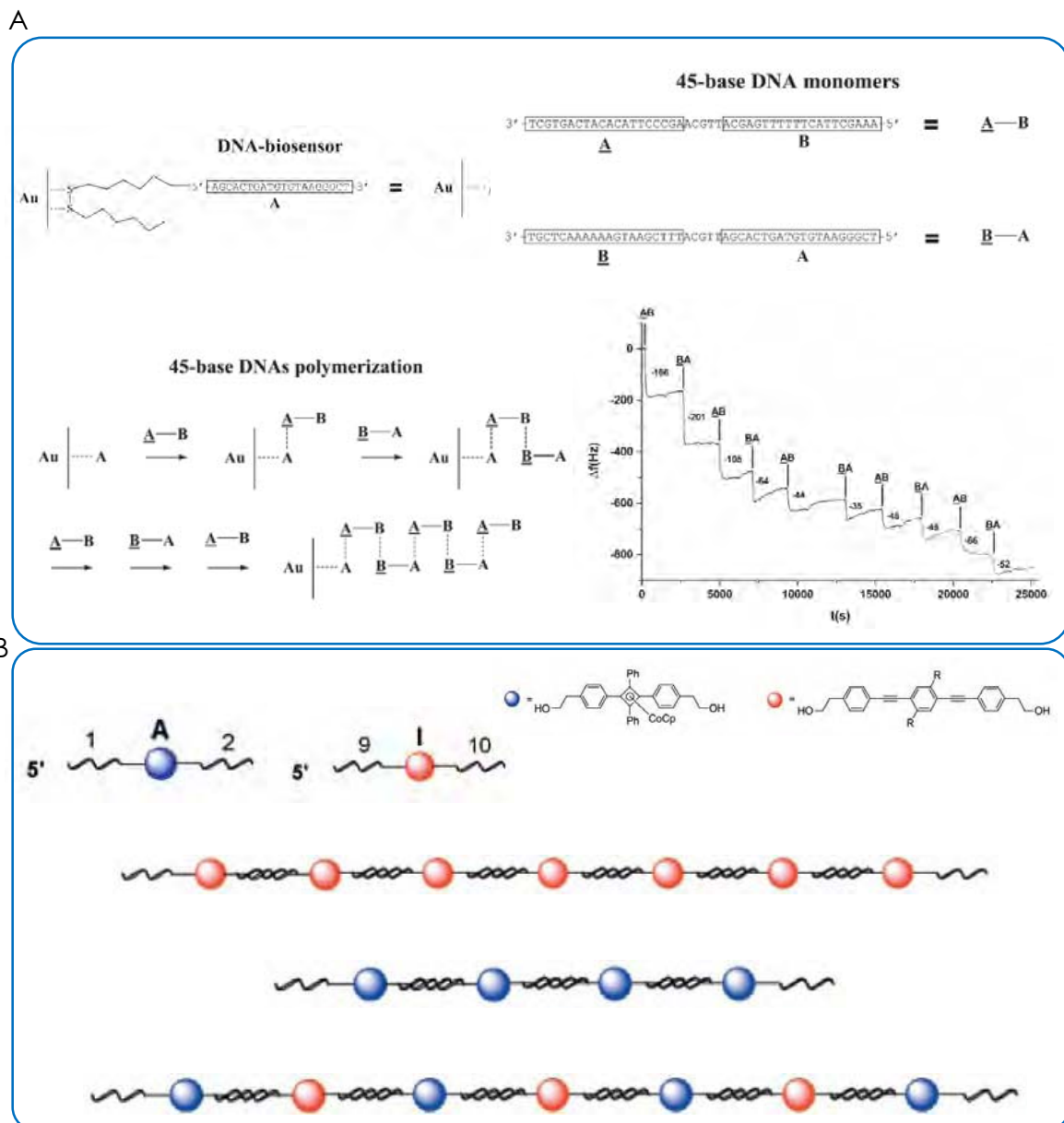


Figure 18 – A – Polymérisation d'oligonucléotides de 45 bases (diblocs) et suivi par QCM.²⁹ B – Formation de polymères mono ou di-blocs à l'aide de séquences nucléiques.³⁰

Les deux exemples précédents se rapprochent d'une polymérisation classique à savoir la croissance de la structure par la répétition de parties identiques. Avec la même idée, mais une forme finale différente, Y. Weizmann et al. ont imaginé un polymère constitué d'entrelacs de catenanes d'ODNs (Figure 19 A).³¹ Des séquences avec deux parties complémentaires à leurs extrémités et au centre permettent de former des entrelacs de cycles que l'équipe ferme à l'aide de l'action de ligases. Cette chaîne de cycles d'ODNs présente sur chaque maillon la constituant deux parties non hybridées qui permettent une hybridation future d'une molécule d'intérêt, comme par exemple un oligonucléotide portant un fluorophore qui permet de mettre en évidence la structure globale de l'objet par microscopie de fluorescence.

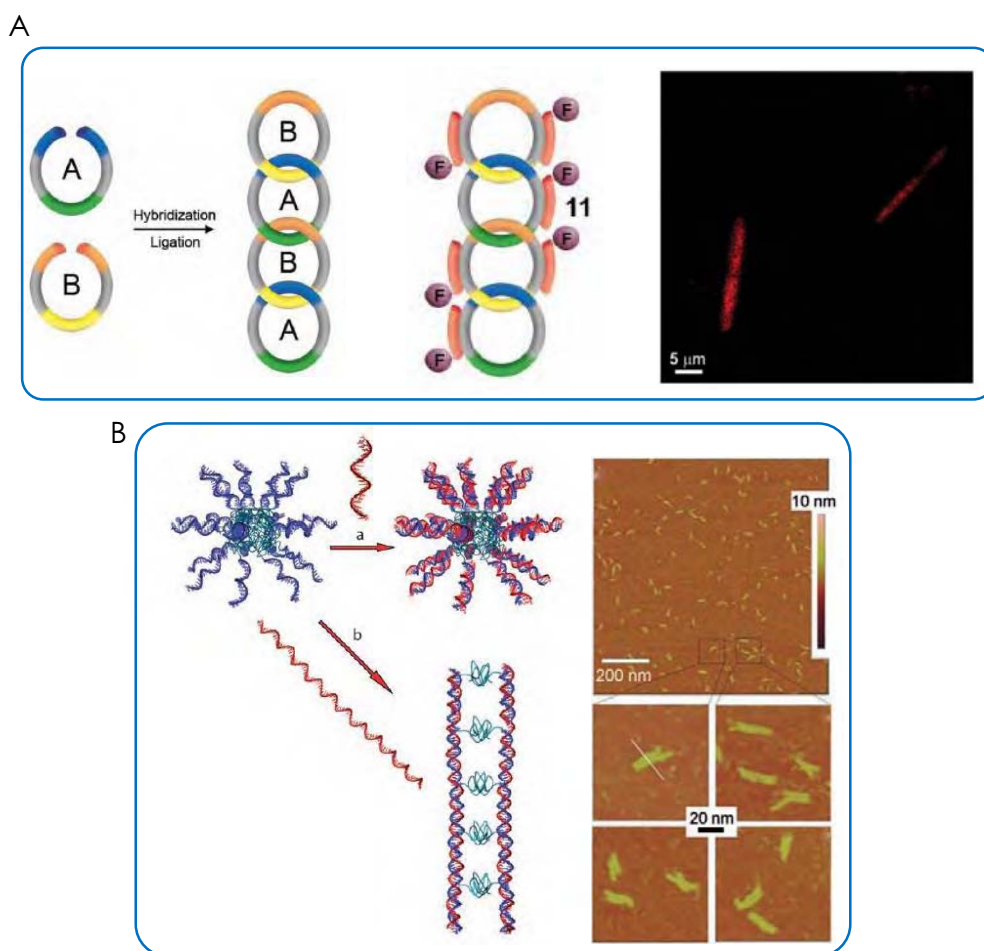


Figure 19 – A – Formation de polymères de cycles d'oligonucléotides, incorporation de fluorophores sur la structure et visualisation de celle-ci par microscopie de fluorescence.³¹ B – Micelle de polymère décorée par des double-brins d'ADN et structuration en échelle grâce à un long oligonucléotide qui sert de guide. Images AFM de la structure obtenue.³²

Bien que les oligonucléotides puissent servir de composant de polymérisation, ils peuvent également servir à étendre des polymères classiques. Dans ce cas-là, la formation d'un copolymère ODN/polymère classique peut conduire à des structures particulières (Figure 19 B). A partir d'un polymère de PPO (polyoxyde de propylène) et d'un ODN de vingt-deux bases, une micelle avec des ODNs simple-brins à sa périphérie a été obtenue.³² Cette structure permet une hybridation future avec d'autres simple-brins complémentaires (Figure 19 B a), mais également une structuration en forme d'échelle de ces micelles par l'utilisation de longs brins *template* (Figure 19 B b).

L'extension de structures moléculaires peut conduire à des assemblages moléculaires tridimensionnels formés d'ODN qui ont des structures dendrimériques. En 1999, Shchepinov et al. insèrent des ODNs sur la périphérie de dendrimères de PEG et forment des duplex sur la périphérie.³³ L'utilisation d'ODNs permet d'assembler plusieurs de ces structures entre elles et de former un assemblage hybride dendrimère/ADN.

Dans une revue plus récente, U. Feldkamp, B. Saccà et C. Niemeyer montrent l'utilisation combinée de dendrimères et d'ODNs.³⁴ Dans cette revue, plusieurs structures sont abordées, notamment des dendrimères uniquement constitués d'ODNs (Figure 20 A). Ces structures peuvent être assemblées ensemble par hybridation de *sticky ends* et ainsi former un réseau polymérique (Figure 20 B).³⁵ Enfin, de telles structures peuvent faire l'objet d'applications spécifiques, comme la production de protéines sur un gel d'ODNs.³⁶ Des 4WJ sont liées entre elles par un duplex codant pour une protéine par l'action d'une ligase (Figure 20 C-1, visualisation C-2). L'action future de RNA-polymérase et de ribosomes permet de biosynthétiser des protéines (Figure 20 C-3).

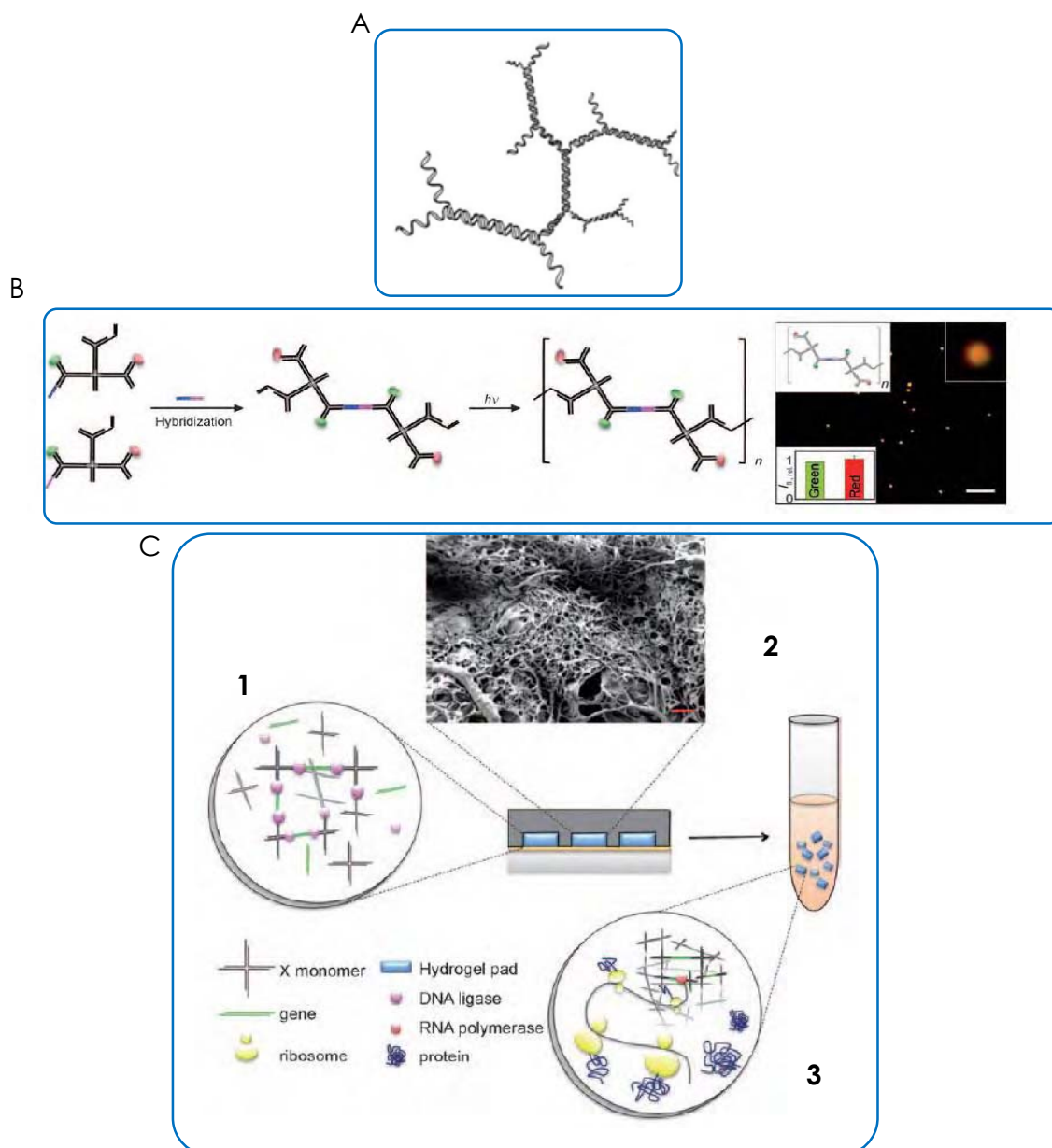


Figure 20 – A – Dendrimère constitué uniquement de séquences nucléotidiques.³⁴ B – Formation d'un réseau polymérique à base de la structure précédente.³⁵ C – Utilisation d'un gel d'ODNs pour la production de protéines.³⁶

2.6.3. La formation de structures cycliques

L'utilisation combinée d'oligonucléotides et de molécules organiques peut conduire à des assemblages mieux contrôlés. Parmi ces structures, il est possible d'obtenir des structures cycliques. Par l'utilisation d'une molécule centrale, Lundberg et al. ont synthétisé une étoile à trois branches centro-symétrique d'ODN (Figure 21 A).³⁷ Cette étoile leur a servi à former un réseau plan constitué de quatre hexagones, en utilisant la spécificité des séquences des étoiles.

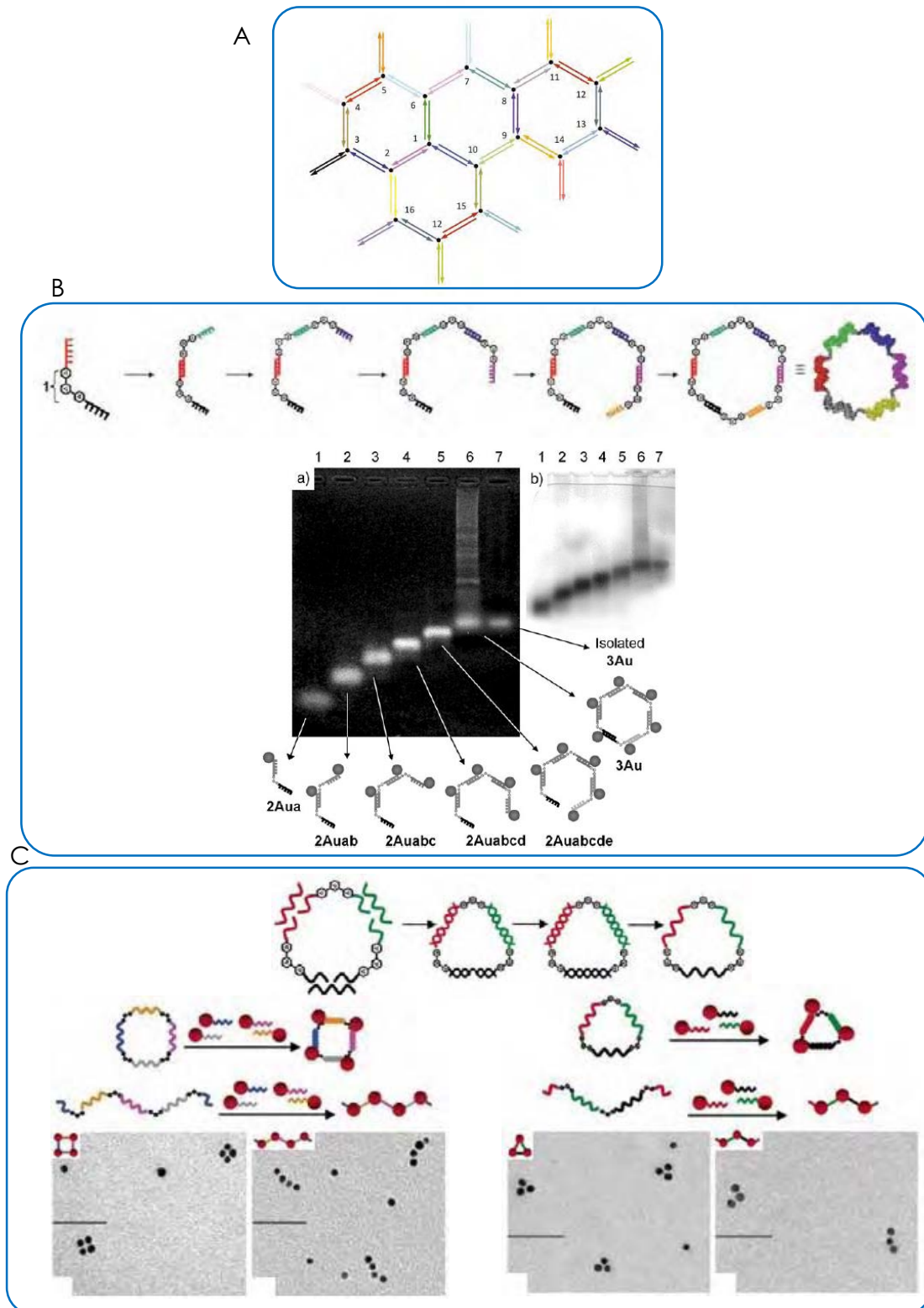


Figure 21 – A – Formation d'hexagones d'ADN.³⁷ B – Formation d'un cycle hexagonal d'oligonucléotides et immobilisation de nanoparticules d'or sur la structure.³⁸ C – Formation de cycles fermés triangulaires ou carrés et immobilisation de nanoparticules sur la structure.³⁹

Dans un esprit similaire, H. Sleiman et F. Aldaye ont montré la formation séquentielle d'un assemblage hexagonal (Figure 21 B).³⁸ Cette structure est obtenue par l'hybridation de séquences reliées entre elles par des triphényles en position méta, ce qui donne un angle fixe à la structure. L'incorporation de nanoparticules d'or sur les extrémités des séquences permet de les positionner à chaque angle de l'hexagone comme le montre le gel de PAGE.

Avec une méthodologie similaire, l'équipe a formé des cycles triangulaires et carrés.³⁹ Les groupements triphényles liés à deux séquences nucléiques sont reliés par des brins complémentaires *template* (Figure 21 C). Par l'action de ligases, les cycles sont fermés et le brin *template* devient inutile laissant la place pour l'hybridation à d'autres oligonucléotides liés à des nanoparticules d'or.

2.6.4. Du cycle à la structure géométrique tridimensionnelle

Nous venons de voir que des cycles nucléiques peuvent être formés avec l'utilisation de molécules tierces. L'équipe de H. Sleiman a continué ses travaux et a formé un éventail de cycles allant de 3 à 6 côtés⁴⁰. En utilisant l'hybridation et de longs brins d'ADN servant à relier deux cycles entre eux, l'équipe a formé des polygones 3D. Cette méthode leur a permis également de former des structures polygonales avec deux bases différentes HP et BP (Figure 22 A). Les structures peuvent aussi voir leur hauteur varier en fonction de la longueur du brin reliant les deux cycles. Enfin, à l'aide de différents brins complémentaires, la hauteur de la structure peut varier par l'ajout de différents brins entièrement ou partiellement complémentaires (Figure 22 B).

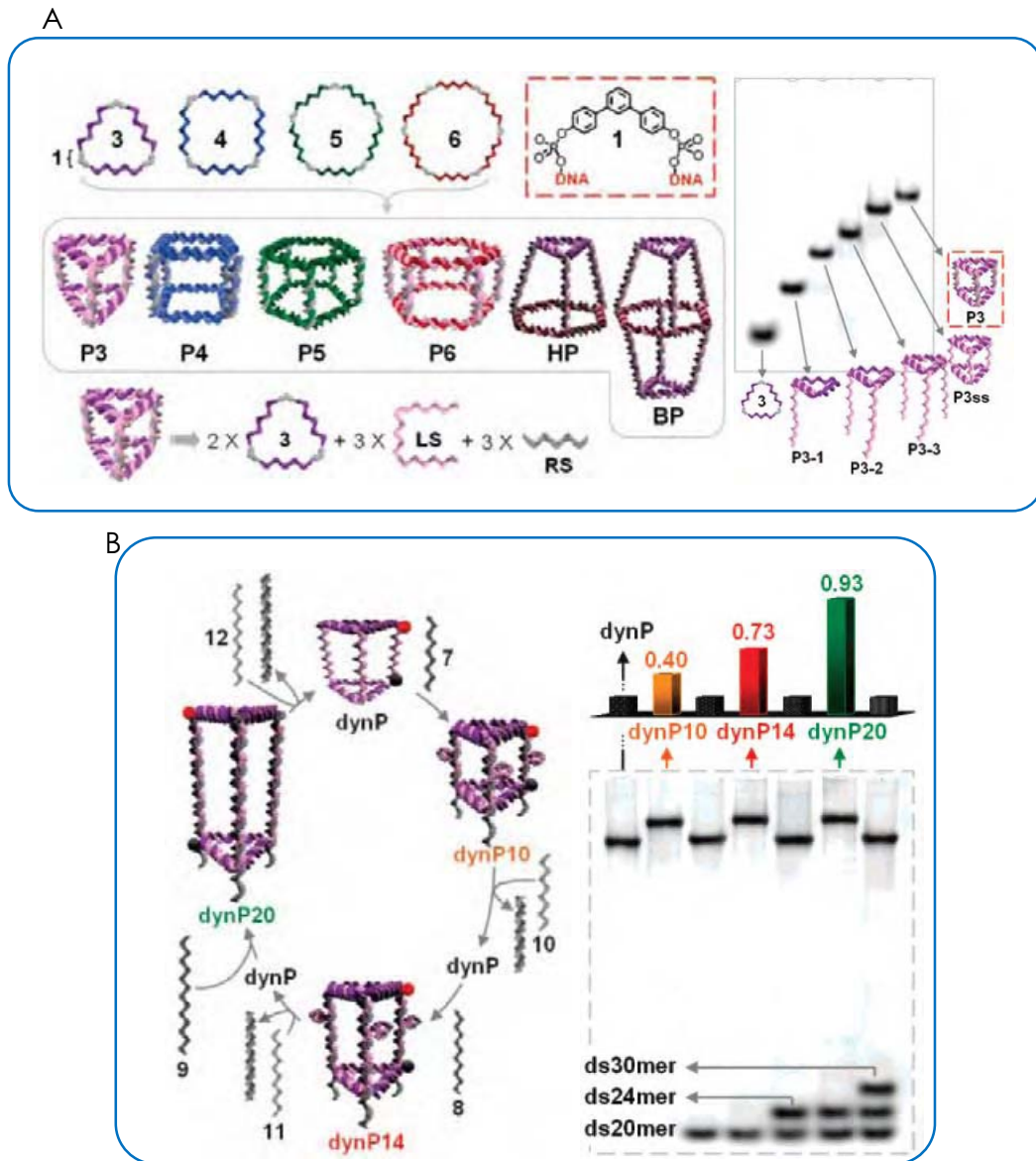


Figure 22 – A – Formation de structures géométriques à partir de cycles fermés d'oligonucléotides et visualisation PAGE du grossissement de la structure.⁴⁰ B – Ajustement de la hauteur de la structure grâce à la modularité de l'hybridation et suivi par PAGE.⁴⁰

2.6.5. Structures géométriques 3D

2.6.5.1. Structure tétraédrique

Comme nous venons de le voir, des structures tridimensionnelles précises ont été imaginées sur la base de l'agencement modulaire des duplex. Le tétraèdre est une structure qui a été de nombreuses fois synthétisée. Comme l'ont montré R. Goodman et al., la structure peut se construire à partir de quatre brins principaux (Figure 23 A).⁴¹ Une fois l'hybridation effectuée, les brins sont liés par l'action de

ligases qui vont fixer la structure. Cette structure est assez simplement obtenue : un mélange équimolaire dans un milieu tamponné dans des conditions classique d'hybridation du double-brin donne un rendement d'environ 95%. La bipyramide tétraédrique, extension directe de cette structure a été réalisée (Figure 23 B).⁴² L'utilisation de séquences spécifiques est nécessaire et suffisante pour obtenir cette structure à partir de 6 oligonucléotides faisant chacun le tour d'une face de la structure.

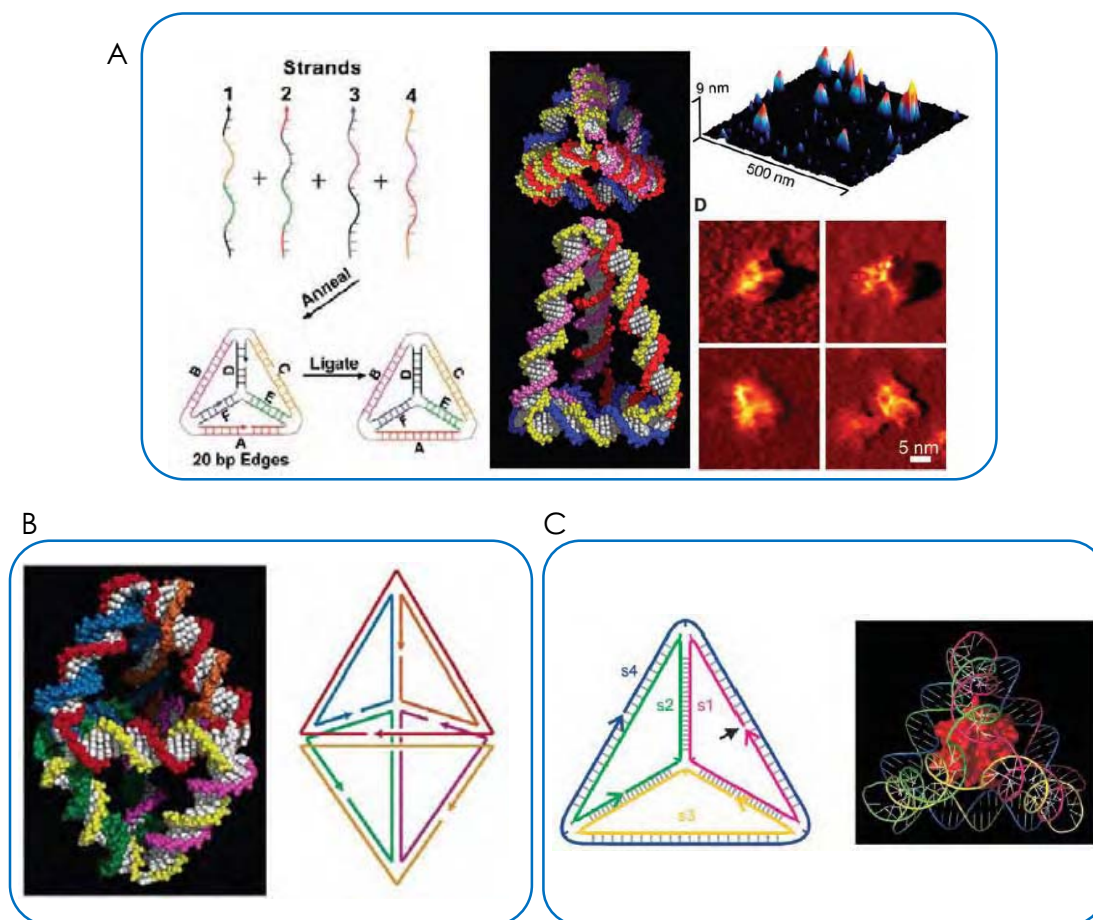


Figure 23 – A – Construction d'un tétraèdre d'ADN et visualisation schématique, topographie et imagerie AFM.⁴¹ B – Formation d'une bipyramide tétraédrique d'ADN.⁴² C – Internalisation d'une protéine de Cytochrome C à l'intérieur d'un tétraèdre d'ADN.⁴³

Enfin, l'équipe a internalisé une protéine au sein de la structure tétraédrique en synthétisant une séquence nucléique liée chimiquement à cette protéine (cytochrome C). Le positionnement correct de la protéine sur la séquence permet de choisir la position à laquelle elle se trouvera lors de l'hybridation : à l'intérieur de la structure et non à l'extérieur (Figure 23 C).⁴³

Le tétraèdre d'ADN a également été utilisé pour des applications diverses en tant que structure moléculaire rigide, robuste et modulaire pouvant être obtenue aisément. C. Simmons et al. ont utilisé ce tétraèdre d'ADN et l'ont internalisé au sein d'un matériau poreux pour faire du transfert électronique (Figure 24 A).⁴⁴ Une autre application met en place un système électrochimique servant à la détection de cocaïne.⁴⁵ Le tétraèdre est fixé sur un support et le système électrochimique lui est lié (Figure 24 B). Les travaux permettant de fixer un système à un support par l'intermédiaire d'une structure nucléique ont fait l'objet d'une revue.⁴⁶ Le marquage fluorescent de ce tétraèdre a également été obtenu par intercalation de molécules fluorescentes entre les bases.⁴⁷ Du transfert électronique a pu être effectué sur cette structure (Figure 24 C).

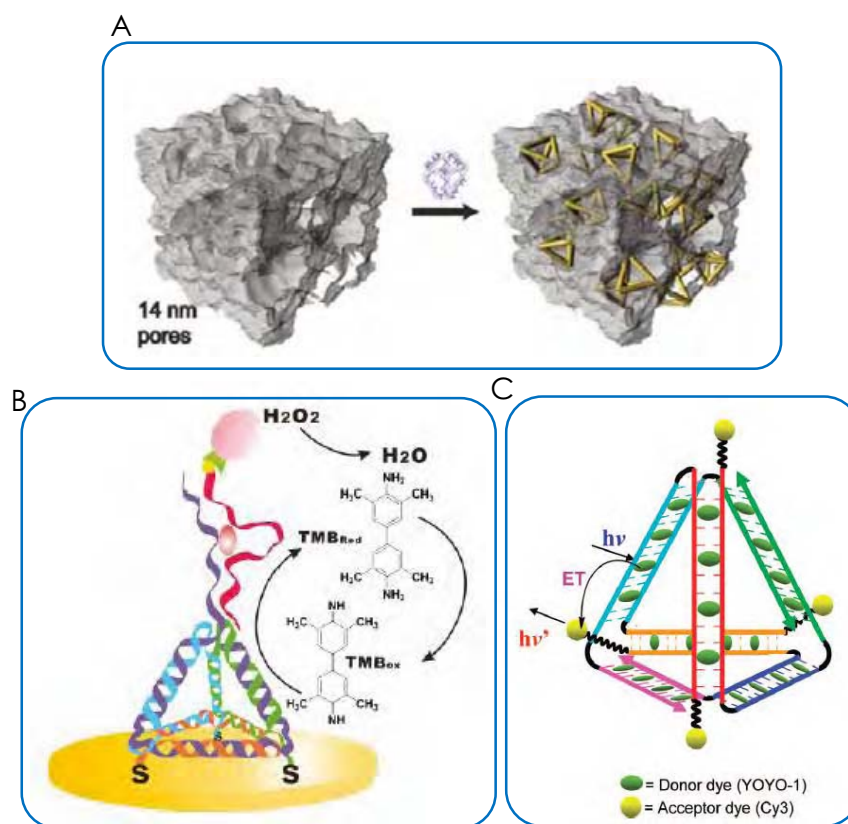


Figure 24 – A – Internalisation de tétraèdres d'ADN au sein d'une poudre de TiO_2 poreuse.⁴⁴ B – immobilisation d'un système électrochimique sur une surface grâce à un tétraèdre d'ADN.⁴⁵ C – Marquage fluorescent et transfert électronique sur des structures oligonucléotidiques.⁴⁷

2.6.5.2. Structure icosaédrique

Parmi les structures nucléiques tridimensionnelles, une structure géométrique particulière a été obtenue : l'icosaèdre.⁴⁸ Deux étoiles nucléiques à 5 et 6 branches terminées par des *sticky ends* ont permis d'assembler une structure icosaédrique. Dans les deux cas, l'icosaèdre est le même (Figure 25) et basé sur

l'étoile à cinq branches. L'étoile à six branches permet de former le même icosaèdre avec une séquence supplémentaire permettant d'immobiliser une molécule de doxorubicine, un anticancéreux à des fins thérapeutiques. Les tests *in vitro* montrent que la structure ainsi obtenue s'intègre dans les cellules cancéreuses cible.

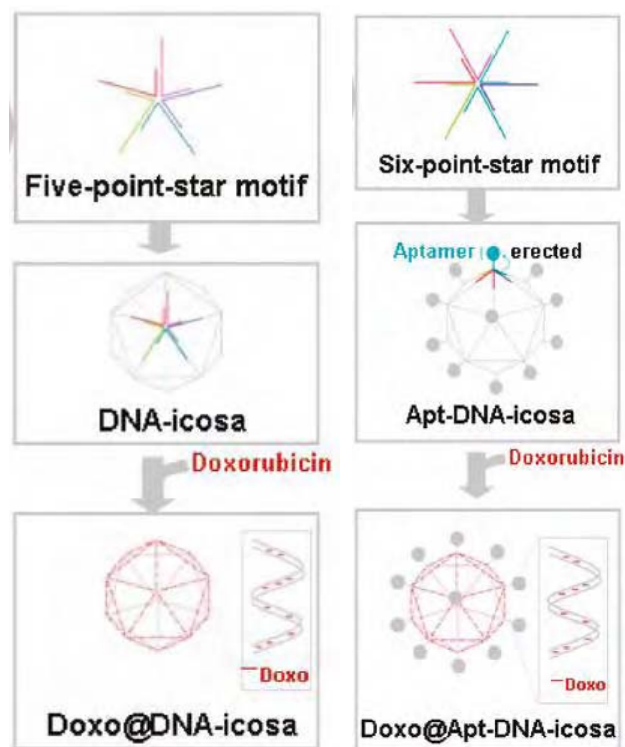


Figure 25 - Formation d'icosaèdre d'oligonucléotides à partir d'étoiles à 5 et 6 branches et marquage des structures avec de la doxorubicine.⁴⁸

2.7. Conclusions

Dans cette partie, l'oligonucléotide a montré tout son potentiel et sa modularité comme molécule d'assemblage. L'obtention de structures simples n'impliquant que quelques séquences nucléiques ainsi que des molécules plus complexes avec un nombre grandissant d'ODNs montre bien que l'ADN est une molécule de structuration puissante. L'utilisation de molécules tierces a permis d'ajouter en spécificité aux structures. Ces molécules ont été intégrées par intercalation du double-brin ou par synthèse d'une séquence nucléique modifiée, apportant leurs spécificités à la structure ainsi que leurs propriétés.

3. ADN et métaux : structuration

Dans le panel de modifications des séquences nucléiques, une d'entre elle est importante : la modification de séquences par des complexes métalliques. Les propriétés et les spécificités des métaux peuvent apporter énormément à des structures : la géométrie, la photochimie et la photophysique propres des complexes métalliques peuvent être autant d'atouts.

3.1. *M-DNA* : incorporation d'atomes métalliques au sein du double-brin

Une des premières utilisations de métaux au sein de duplex d'ADN a mis en œuvre la complexation de métaux avec les bases nucléique. Ces structures que l'on appelle *M-DNA* sont formées par des atomes métalliques complexés à des nucléotides. On a pu ainsi former des paires peu communes dans des conditions de pH particulières ($\text{pH} > 8$) : des paires T-G et des paires A-C.⁴⁹ La liaison de deux bases nucléiques ne se fait plus par liaisons hydrogène mais par complexation d'un métal quadrivalent (Zn^{2+} , Co^{2+} ou Ni^{2+}). Ces structures ont permis un transfert électronique le long d'un duplex et ont également pu être obtenus sur des duplex d'ADN biologique.⁵⁰

L'ajout d'un métal pour former une structure particulière peut avoir des conséquences inattendues. H. Sleiman et son équipe ont synthétisé deux assemblages basés sur un groupe centro-symétrique comprenant quatre phényles (Figure 26 a, molécule 1) duquel partent deux oligonucléotides (2 ou 2').⁵¹ Les séquences ont été choisies de telle sorte à être complémentaires et l'hybridation de ces deux molécules donne un ensemble de structures possibles (Figure 26 a, structures 4-6). L'ajout d'un complexe de trisbipyridylruthénium (II) lors de l'hybridation a étonnement permis de n'obtenir qu'une seule structure (Figure 26 a, structure 5). Chose intéressante, l'ajout du même complexe après hybridation et obtention de plusieurs produits a également permis de récupérer un seul et même assemblage. L'utilisation d'une structure de départ comprenant non plus deux mais trois séquences nucléiques a permis de former la même structure, à la différence qu'ici un oligonucléotide dépasse de chaque angle (Figure 26 b, structure 7). Les séquences non engagées dans une hybridation ont été choisies afin de pouvoir s'hybrider avec la structure voisine comme le montre le schéma de la Figure 26 b. L'assemblage se construit sous forme d'échelle (8) ce que confirme l'AFM (Figure 26 c). Dans cet exemple, le complexe métallique ne fait pas partie intégrante de la structure, mais son interaction avec les bases permet de contraindre la structure finale de l'assemblage.

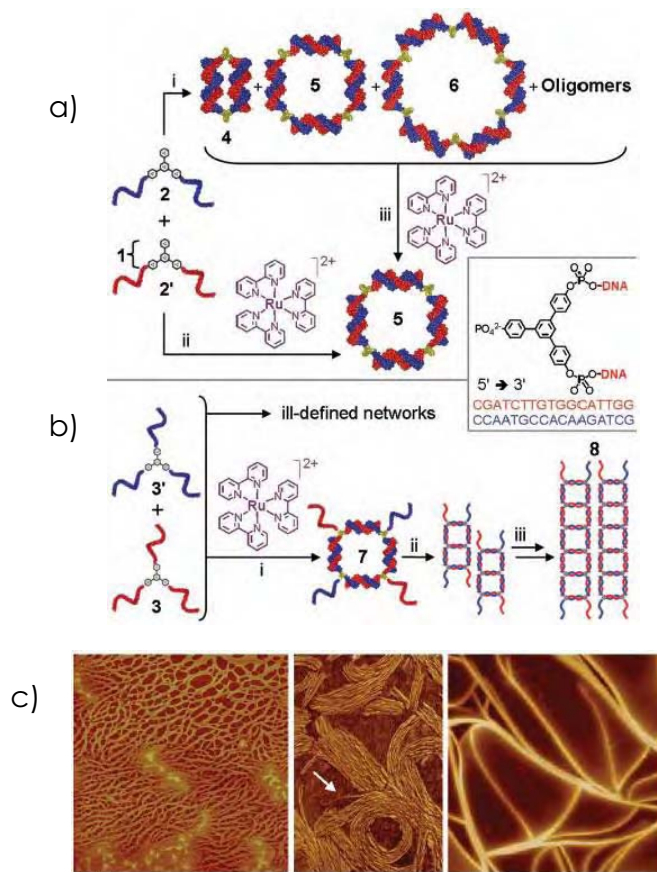


Figure 26 - Incorporation d'un complexe de ruthénium (II) comme *template* d'un assemblage d'ADN. Visualisation AFM de l'échelle obtenue (gauche = assemblage obtenu sans incorporation de complexe de ruthénium ; centre et droite = échelles obtenues par effet *template* lors de l'introduction d'un complexe de ruthénium ; barres = 1 μ m).⁵¹

3.2.Modification de bases : incorporation contrôlée d'atomes métalliques

3.2.1. Insertion de bases artificielles au sein de la double-hélice d'ADN

La liaison ADN-métal possède des limites assez évidentes en termes structuraux. Elles peuvent cependant être dépassées par la modification des bases nucléiques au sein de l'ODN. La synthèse automatisée des oligonucléotides permet ici d'incorporer aisément les bases modifiées sur la structure.⁵²

K. Tanaka et al. ont mis au point des ODNs dans lesquels des bases artificielles ont été insérées et qui permettent la complexation d'un atome métallique (Figure 27 A).⁵³ Dans un premier temps, un nucléotide artificiel a été synthétisé, la base étant remplacée sur le désoxyribose par un groupement 1,2-bisaminophényle. Les

oligonucléotides obtenus par synthèse avec cette base, ont permis la complexation d'un métal de géométrie plan-carré. C'est ainsi que l'équipe a pu insérer un atome de Pd^{2+} au sein de la structure, insertion suivie par RMN avec le changement du déplacement chimique des protons des amines en fonction de la quantité de Pd^{2+} insérée.

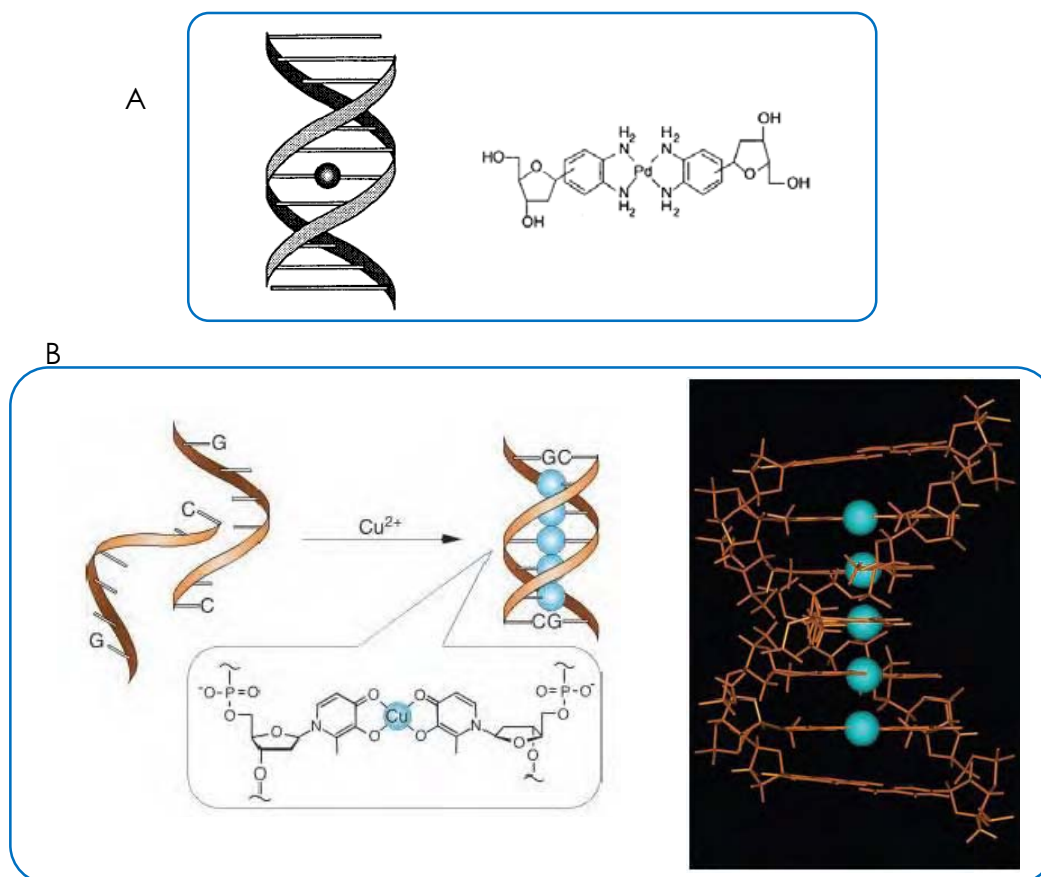


Figure 27 – A – Insertion d'un atome de Pd^{2+} au sein d'une double-hélice nucléique par modification de bases.⁵³ B – Insertion de 1 à 5 atomes de Cu^{2+} avec modification des bases nucléiques.⁵⁴

Avec une autre base artificielle, présentant des fonctions cétones et hydroxyles, d'autres *M-DNA* ont été obtenus (Figure 27 B).⁵⁴ Le métal inséré est du Cu^{2+} de géométrie plan-carrée. La différence importante avec le travail précédent est l'introduction de un à cinq atomes de cuivre adjacents sur une seule double-hélice de trois à sept bases.

Avec l'introduction d'un aldéhyde salicylique, G. Clever et al. ont également synthétisé une base nucléique artificielle pour insérer des atomes métalliques au sein du duplex.⁵⁵ Face-à-face, deux de ces bases permettent de former un pont salin avec des atomes métalliques de géométrie plan-carré (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} , Figure 28 A). L'ajout d'une telle modification confère au duplex une stabilité

accrue avec une température de dénaturation augmentée de 40 °C dans le meilleur des cas.

Avec un objectif similaire, d'autres modifications aux bases nucléiques ont été apportées avec cependant une méthodologie un peu différente. T. Rhül et E. Stulz ont synthétisé deux couples de bases reliées par une porphyrine de zinc et un complexe de ruthénium bisterpyridine⁵⁶. Ces deux couples de bases sont ensuite insérés lors de la synthèse automatisée d'ODNs (Figure 28 B).

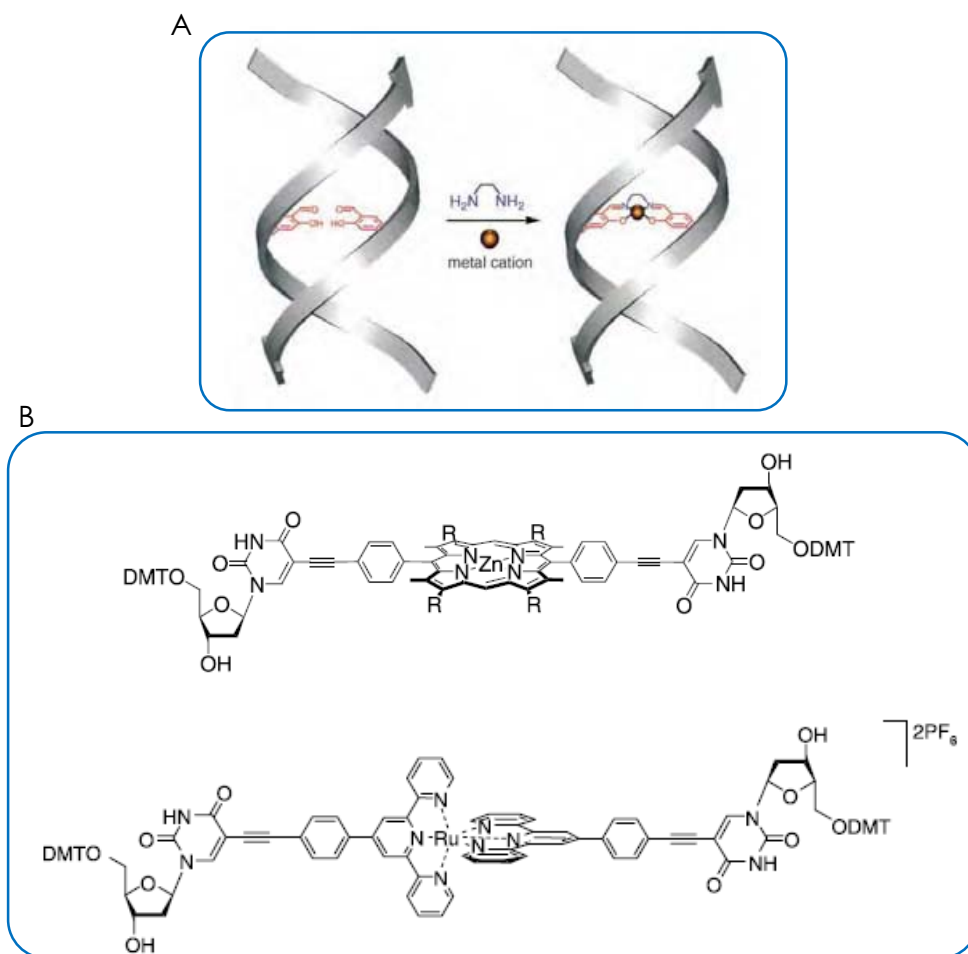


Figure 28 – A – Insertion d'une paire de bases permettant de former un pont salin dans une double-hélice nucléique.⁵⁵ B – Modifications d'uridines avec une porphyrine et une terpyridine pour insertion dans la synthèse automatisée d'oligonucléotides.⁵⁶

3.2.2. Modification des bases pour insertion d'un métal externe à la double-hélice

La modification de bases nucléiques peut avoir pour but l'insertion d'atomes métalliques dans la structure interne du duplex, mais elle peut également servir à insérer un métal sur l'extérieur du duplex. C. Wirges et al. ont synthétisé deux bases nucléiques dérivées de l'uridine terminées par des diols (Figure 29 A).⁵⁷ Ces bases ont été utilisées lors de la synthèse des ODNs puis après hybridation, les diols terminaux ont été transformés en aldéhydes. La transformation des fonctions aldéhyde en fonctions acide carboxylique permet enfin de complexer des atomes d'argent qui par la suite ont permis la nucléation de *nanoclusters* autour de la double-hélice. L'image HR STEM montre une nucléation régulière de *nanoclusters* le long du brin (image Figure 29 A).

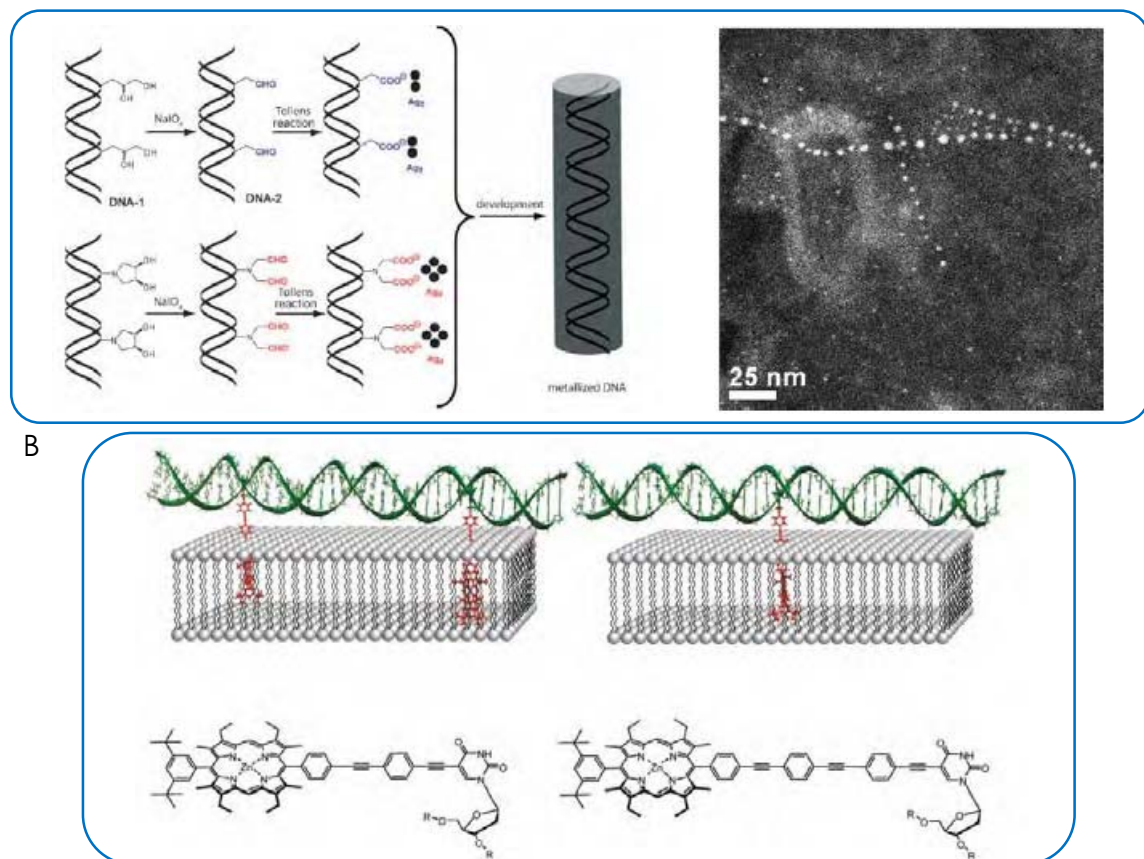


Figure 29 – A – Nucléation de *nanoclusters* d'Ag⁺ autour d'une double-hélice d'ADN par la modification de bases nucléiques et image HR-STEM.⁵⁷ B – Fonctionnalisation de bases nucléique avec une ancre porphyrinique pour attachement sur une bicouche lipidique.⁵⁸

Pour une application biologique – attacher une double-hélice à la surface d'une bicouche lipidique – K. Börjesson et al. ont mis au point deux bases nucléiques modifiées (Figure 29 B).⁵⁸ Le but est d'obtenir une ou deux porphyrines à

zinc immobilisées sur un oligonucléotide pour servir d'ancre dans une bicouche lipidique. Une base nucléique modifiée a été synthétisée à partir d'une thymine, modifiée avec une chaîne comportant deux ou trois répétitions d'un motif phénylalcyne pour obtenir deux distances différentes entre l'oligonucléotide et la porphyrine. Une ou deux bases modifiées ont été incorporées dans un ODN et ont permis sa fixation à des bicouches lipidiques. Les études de l'assemblage ont montré que deux porphyrines étaient nécessaires pour obtenir un ODN tangent à la bicouche.

Les exemples que nous avons vu jusqu'à maintenant présentent des associations métal/oligonucléotides qui permettent de fonctionnaliser une double-hélice nucléique, mais les structures obtenues ne sont finalement pas des objets de construction à proprement parler. La propriété d'auto-hybridation de l'ADN n'est pas exploitée en termes structuraux. Nous allons voir par la suite, que l'ajout des métaux sur des ODNs allié à la complémentarité des séquences permet de structurer des assemblages distincts.

3.3. Liaison oligonucléotide – complexe métallique

3.3.1. Objets linéaires

La synthèse supportée a été utilisée par l'équipe de H. Sleiman qui a mis au point une structure basée sur un complexe de ruthénium (II) reliant deux oligonucléotides (Figure 30 A).⁵⁹ Pour cette structure, une synthèse sur support solide a permis de former des séquences nucléiques de mêmes longueurs ne comportant que des thymines et d'insérer un complexe de ruthénium bisbipyridine bisimidazole modifié avec des groupements phosphoramidite pour la synthèse nucléique automatisée. Le clivage des oligonucléotides du support permet d'obtenir une structure symétrique d'ODNs séparés par un complexe de ruthénium (II). Ces objets ont par la suite été hybridés avec la séquence complémentaire – à savoir un oligonucléotide composé de 10 bases adénine, et les T_m ont été mesurées, donnant des températures très proches du simple duplex A_{10}/T_{10} .

H. Sleiman et son équipe ont synthétisé un objet avec une méthodologie similaire, mais sans espaceur entre le complexe de ruthénium et les oligonucléotides (Figure 30 B).⁶⁰ Le complexe de ruthénium est aussi légèrement différent, une bipyridine est employée à la place des imidazoles. Les séquences nucléiques sont aussi différentes, il ne s'agit plus de l'enchaînement de thymines, mais de séquences spécifiques plus courtes constituées des quatre bases nucléiques. La méthode employée reste cependant la même : les ODNs sont synthétisés sur le support, puis le complexe est ajouté et lié à deux d'entre eux. Une synthèse similaire

leur a permis d'obtenir les mêmes structures avec une 2,2'-bipyridine à la place du complexe de ruthénium. Des assemblages de ces ODNs sont obtenus en mélangeant dans des quantités stœchiométriques les structures à séquences complémentaires. Deux dimères sont obtenus avec le complexe de ruthénium ainsi que des carrés en utilisant des structures obtenues avec la 2,2'-bipyridine. Dans les deux cas, des oligomères sont également obtenus, bien que moins présents en utilisant des complexes de ruthénium (PAGE Figure 30 B).

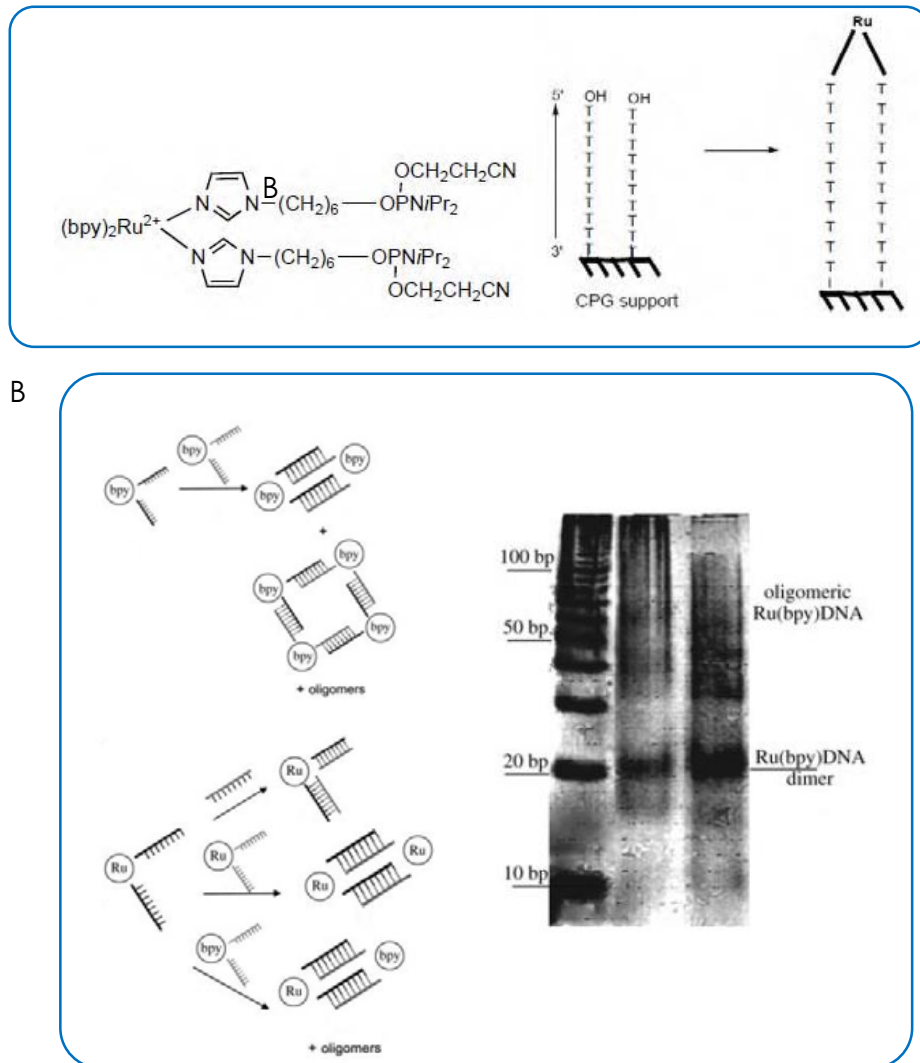
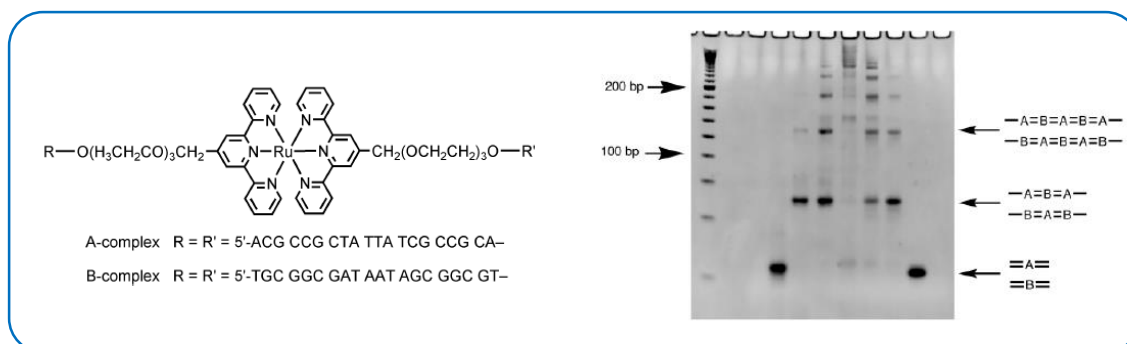


Figure 30 – A – Liaison de deux oligonucléotides décathymines par un complexe de ruthénium⁵⁹. B – Formation d'assemblages à base de complexe de ruthénium et d'oligonucléotides, analyse PAGE des résultats obtenus.⁶⁰

En utilisant un complexe de ruthénium bisterpyridine K. Stewart et L. McLaughlin ont obtenu des assemblages similaires (Figure 31 A).⁶¹ La synthèse est différente des cas précédents. Le premier oligonucléotide est formé dans le sens 3' vers 5', puis le complexe est lié, et enfin l'autre brin est synthétisé cette fois-ci dans le sens

5' vers 3'. Les séquences ont été choisies identiques afin d'obtenir une structure symétrique. Deux structures similaires ont été synthétisées, la seule différence étant leurs séquences nucléiques. Elles ont été choisies pour être complémentaires d'une structure à l'autre (complexes A et B Figure 31 A). Leur hybridation a permis d'obtenir divers assemblages, sans maîtrise de la taille finale de la structure. Les assemblages comportant le moins de répétition ont pu être identifiés par PAGE.



B

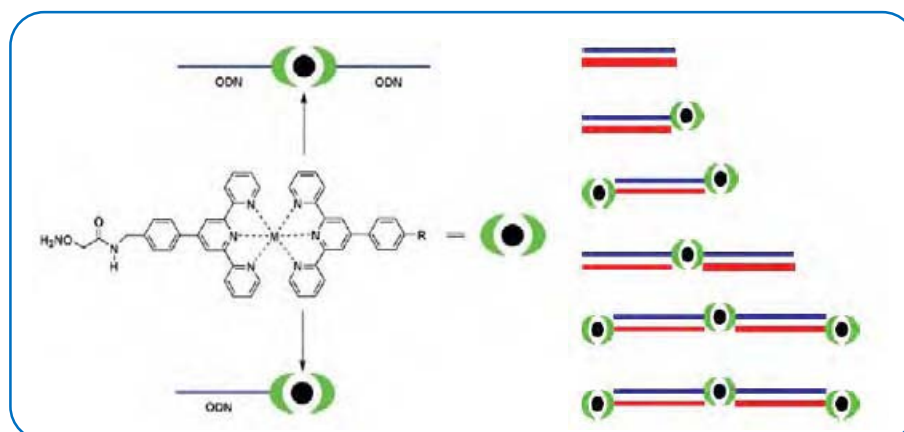


Figure 31 – A – Synthèse de structures linéaires hybrides complexes de ruthénium/ADN.⁶¹ B – Synthèse d'objets linéaires métal-ADN avec un atome métallique lié à un ou deux oligonucléotides.⁶²

S. Ghosh et al. ont mis au point une structure similaire mais avec une synthèse différente (Figure 31 B).⁶² Deux complexes ont été utilisés : un complexe de fer (II) et un de ruthénium (II). Ces deux métaux peuvent former des complexes de géométrie identique avec deux terpyridines. La complémentarité des séquences liées aux complexes de ruthénium a permis d'assembler entre elles plusieurs de ces structures de manière linéaire. Cependant, comme précédemment, des assemblages oligomériques de ces structures sont également obtenus.

M. Göritz et R. Krämer ont synthétisé un oligonucléotide lié de la même façon à des terpyridines (Figure 32).⁶³ La différence ici est que deux terpyridines sont liées

sur leurs positions 4' au même oligonucléotide. Cet oligonucléotide peut être hybridé avec un autre brin plus court. L'ajout d'un équivalent d'un atome métallique de Fe^{2+} ou Zn^{2+} par rapport à l'ODN modifié permet de former un cycle avec l'oligonucléotide et le brin plus court est déshybridé. Un deuxième équivalent de Zn^{2+} permet de rouvrir le cycle par complexation et fait office de stimulus chimique.

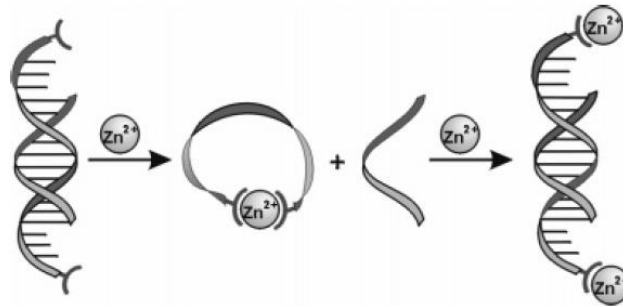


Figure 32 - Cyclisation et ouverture d'un cycle formé d'un oligonucléotide par l'action d'atome métalliques et de l'oligonucléotide complémentaire.⁶³

3.3.2. Structures sur 2 et 3 dimensions

L'utilisation de l'ADN comme élément de construction dans les exemples que nous venons de voir montre des assemblages de type linéaire (même si certaines structures carrées et cycliques ont également été obtenues), i.e. des structures mises bout à bout par l'hybridation d'oligonucléotides. Deux limitations sont visibles : les structures ne sont pas finies dans l'espace et les assemblages sont limités à l'agrandissement sur une seule dimension.

J. Choi et al. ont contourné cette limitation en formant un triangle avec des côtés formés de double-hélices et des angles constitués de complexe de fer (II) bisterpyridine (Figure 33 A).⁶⁴ Les ODNs sont formés sur support, puis une terpyridine – substituée en position 4 et non 4' comme précédemment – est ajoutée à la fin de la synthèse. L'ODN substitué est mis en présence d'un sel de fer (II) et le complexe obtenu permet de lier deux oligonucléotides avec un angle de 90° (Figure 33 A *modules*). Les oligonucléotides sont liés à la terpyridine avec une courte chaîne de trois carbones, ce qui permet de laisser une certaine liberté à l'angle formé par les terpyridines. En utilisant la complémentarité des séquences, trois de ces structures sont assemblées pour former un triangle d'ADN. Cet assemblage présente à lui seul les éléments permettant de passer au-delà des limitations énoncées précédemment : la structure est spécifique, finie dans l'espace et l'assemblage est bidimensionnel.

Dans la même lignée, l'équipe de H. Sleiman a mis au point une structure triangulaire avec des propriétés différentes (Figure 33 B).⁶⁵ La structure n'a plus les mêmes constituants. Le complexe qu'ils ont utilisé est un complexe de Cu(I) de bisphényle phénanthroline. Le ligand est lié par synthèse supportée à un oligonucléotide sur sa position 3'- ou 5'-. Les molécules phénanthroline-ODN obtenues sont hybridées. Ainsi, les deux phénanthrolines se présentent côte à côte et un atome de Cu⁺ tétraédrique peut y être complexé. En synthétisant trois structures avec des séquences complémentaires deux à deux, une structure triangulaire est obtenue (Figure 33 B).

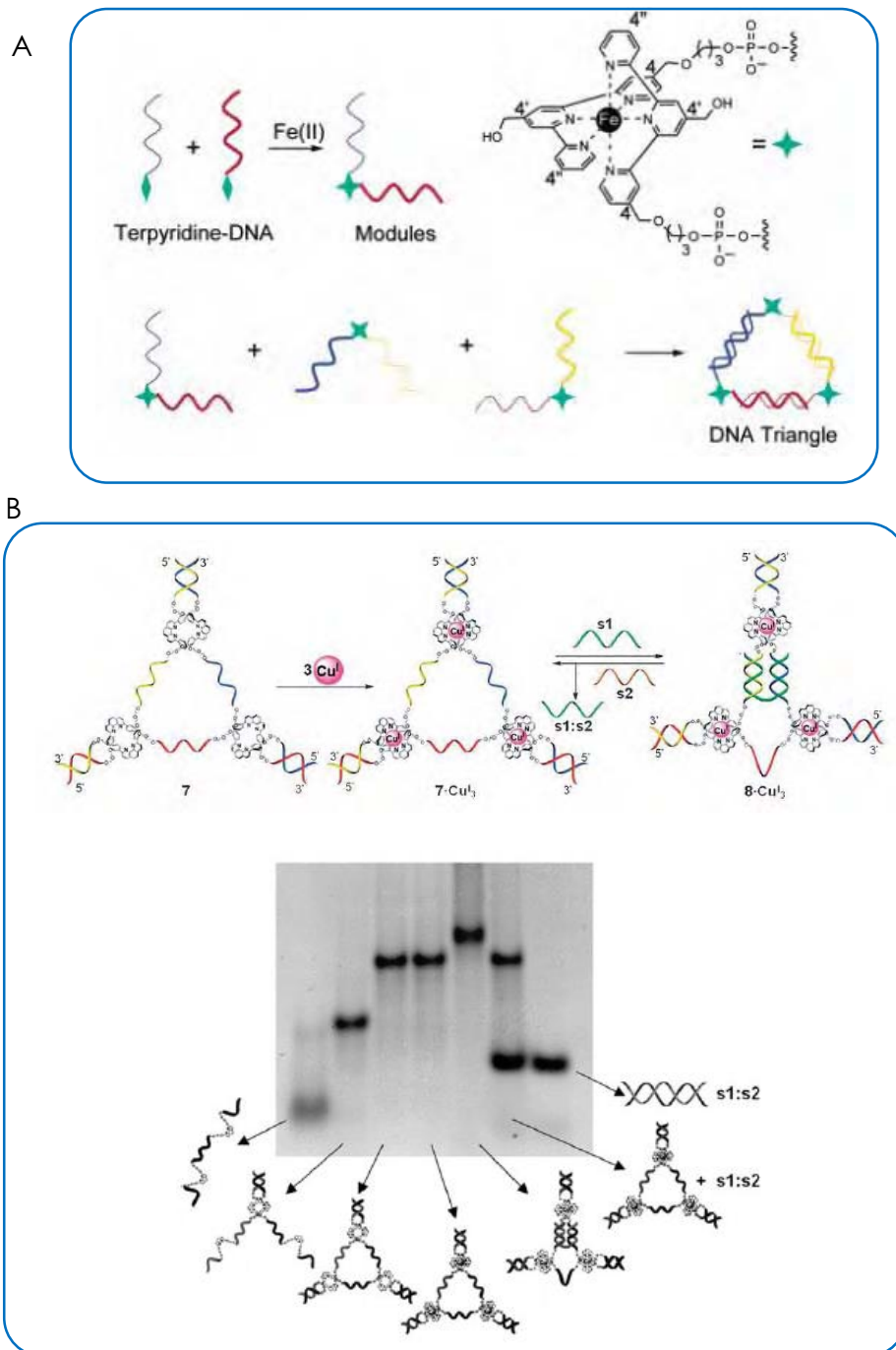


Figure 33 – A – Formation de triangles d'ADN avec des angles formés de fer (II).⁶⁴ B – Formation d'un triangle d'ADN, complexation de Cu (I) et changement conformationnel.⁶⁵

K. Gothelf et al. ont synthétisé des molécules hybrides permettant un assemblage combinatoire constituées d'ODNs et d'une molécule organique centrale.⁶⁶ Celle-ci présente des groupements salicyliques permettant de former des ponts salinés liés à deux ou trois oligonucléotides (Figure 34 molécules LOM et TOM). Ces structures, obtenues par synthèse sur support solide, peuvent s'assembler entre

elles. Le choix des séquences nucléiques permet des assemblages distincts et spécifiques. Le positionnement des ligands face-à-face lorsque les ODNs sont hybridés permet la formation des ponts salen avec un atome de Mn^{2+} à $pH = 8$ qui vont figer la structure. La modularité de la séquence permet la formation de nombreuses structures telles que le montre la Figure 34.

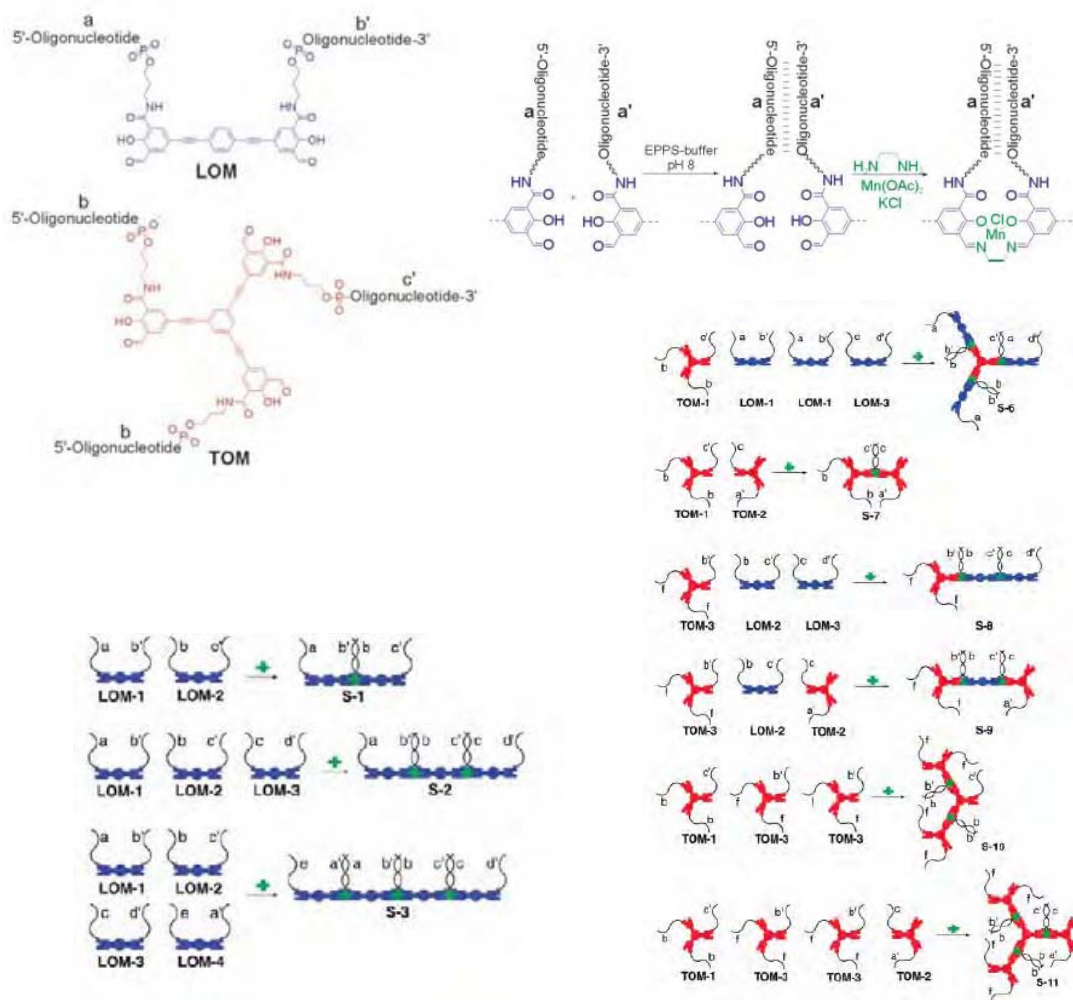


Figure 34 - Chimie structurale : utilisation de l'ADN et de ponts salen avec un sel de manganèse.⁶⁶

K. Stewart et L. McLaughlin ont formé des structures nucléiques composées de quatre séquences liées à un complexe de nickel cyclame (Figure 35).⁶⁷ Un premier ODN est synthétisé sur support, puis un complexe de cyclame de nickel lui est lié et trois autres ODNs sont synthétisés sur le complexe. Deux structures comprenant l'une quatre ODNs identiques et l'autre trois identiques et un différent sont obtenues. Ces deux structures peuvent s'assembler de différentes façons afin de former des assemblages tridimensionnels spécifiques en faisant varier le ratio de

chaque constituant. Nous avons ici clairement un exemple de synthèse et d'assemblage tridimensionnel qui met en avant les propriétés de chaque élément : le complexe métallique donne une géométrie précise à l'ensemble et les ODNs permettent une cohésion de ces centres métalliques dans l'espace.

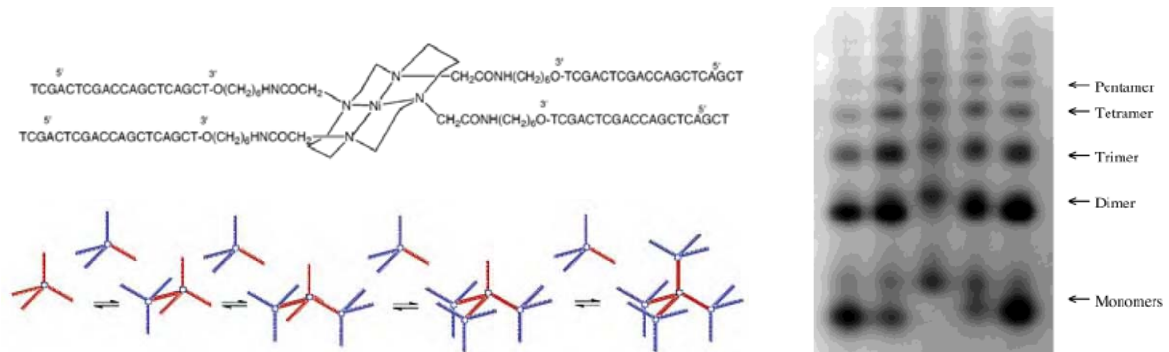


Figure 35 - Synthèse de complexes de nickel cyclame et fonctionnalisation avec 4 oligonucléotides - assemblages possibles et analyse par électrophorèse sur gel d'agarose.⁶⁷

En changeant le centre métallique, l'équipe a formé une étoile tridimensionnelle à six branches nucléiques.⁶⁸ Un premier oligonucléotide est synthétisé (3' - vers 5' -), puis le centre métallique trisbipyridine ruthénium (II) est incorporé, et la synthèse des oligonucléotides est continuée dans l'autre sens (5' - vers 3' -) sur les cinq positions restantes sur le complexe (Figure 36). Une fois en possession de telles structures, l'équipe a synthétisé une deuxième structure similaire avec l'oligonucléotide complémentaire et mis en présence ces deux étoiles. Comme attendu, dans des conditions de mélange de ces deux structures, il n'y a pas de migration lors d'une électrophorèse sur gel d'agarose, ce qui indique la formation de structures tridimensionnelles complexes dont les tailles sont suffisamment importantes pour empêcher toute migration.

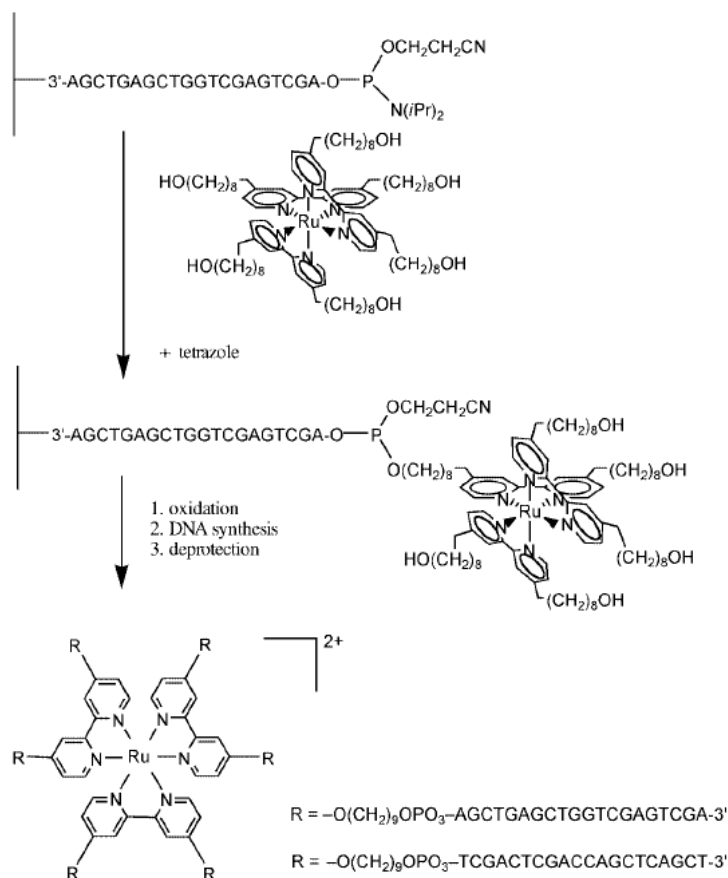


Figure 36 - Formation d'une étoile à six branches nucléiques autour d'un complexe de ruthénium (II) trisbipyridine.⁶⁸

4. Conclusions

Nous avons vu dans ce chapitre que l'ADN peut être un élément de structuration de la matière polyvalent. La propriété des oligonucléotides à s'hybrider par brins complémentaires pour former une double hélice en est une clé. Une autre clé réside dans la possibilité de synthétiser à façon les séquences nucléiques désirées. Cette synthèse a permis également d'incorporer de façon simple et modulaire d'autres molécules que de simples bases : des bases artificielles, des bases modifiées, des molécules organiques préparées spécifiquement ou encore des complexes métalliques qui deviennent des éléments d'assemblage importants.

En partant de la structure même des oligonucléotides, nous avons vu comment des structures de base comme les *four-way junctions* ou encore les *double cross-overs* ont pu former une base solide pour les premiers assemblages. Dans l'ensemble, ces formations sont plus ou moins rigides et l'utilisation combinée des

sticky ends a permis de moduler les structures sur deux ou trois dimensions. Ces structures de base restent cependant limitées en termes de possibilités d'agencement et les assemblages sont rarement contrôlés en termes de tailles.

L'ajout de molécules organiques aux structures a mis en avant des possibilités d'agencement plus précises mais aussi plus polyvalentes. À ce stade, les structures commencent à avoir des formes bien définies et de nombreux domaines s'approprient ces méthodologies : électrochimie, dendrimères, polymères ou encore biotechnologie en sont des exemples.

Enfin, les métaux présentent des caractéristiques propres intéressantes : propriétés rédox, photochimiques et photophysiques, ou encore une géométrie donnée font de ces complexes métalliques des objets d'études intéressants. La modification par synthèse des ligands des complexes métalliques pour leur incorporation dans les chaînes nucléiques a permis d'allier les propriétés des deux entités. Nous avons vu que la géométrie des métaux et la modularité de la double-hélice avaient permis de mettre en place des structures géométriquement contrôlées, avec un placement précis des complexes métalliques.

Dans ce contexte de structuration moléculaire, nous avons envisagé une structuration de la matière basée sur la géométrie octaédrique d'un complexe de ruthénium (II) $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipyridine})_3](\text{PF}_6)_2$. En plus d'une géométrie distincte, ce complexe de ruthénium possède une stabilité chimique importante, avec une constante d'association élevée. En outre, la luminescence de ce complexe est spécifique et connue. La fonctionnalisation du complexe de ruthénium par des entités réactives permet d'envisager sa liaison avec d'autres molécules.

Ici l'ADN intervient. Grâce à la synthèse supportée, il est possible d'introduire des fonctions spécifiques sur des oligonucléotides et d'envisager leur utilisation dans une réaction chimique qui permettrait une liaison avec un complexe de ruthénium.

Enfin, l'association de ces deux entités pour former des molécules hybrides ruthénium/ADN permet d'envisager la formation d'assemblages spécifiques dont les paramètres sont connus et maîtrisés.

Chapitre 1

- (1) Bloomfield, V. A.; Crothers, D. M.; Tinoco, I. J. *Nucleic Acids, structures, properties, and functions*; University Science Books, 2000.
- (2) Stahl, F. W. *Genetics* **1994**, 138, 241.
- (3) Seeman, N. C. *Journal of Theoretical Biology* **1982**, 99, 237.
- (4) Seeman, N. C.; Kallenbach, N. R. *Biophysical Journal* **1983**, 44, 201.
- (5) Mao, C.; Sun, W.; Seeman, N. C. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121, 5437.
- (6) Liu, D.; Wang, M.; Deng, Z.; Walulu, R.; Mao, C. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 2324.
- (7) Fu, T. J.; Seeman, N. C. *Biochemistry* **1993**, 32, 3211.
- (8) Winfree, E.; Liu, F.; Wenzler, L. A.; Seeman, N. C. *Nature* **1998**, 394, 539.
- (9) Liu, H.; He, Y.; Ribbe, A. E.; Mao, C. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2943.
- (10) Yan, H.; Park, S. H.; Finkelstein, G.; Reif, J. H.; LaBean, T. H. *Science* **2003**, 301, 1882.
- (11) He, Y.; Tian, Y.; Chen, Y.; Deng, Z.; Ribbe, A. E.; Mao, C. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, 44, 6694.
- (12) Liu, Y.; Ke, Y.; Yan, H. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 17140.
- (13) Park, S. H.; Pistol, C.; Ahn, S. J.; Reif, J. H.; Lebeck, A. R.; Dwyer, C.; LaBean, T. H. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45, 735.
- (14) LaBean, T. H.; Yan, H.; Kopatsch, J.; Liu, F.; Winfree, E.; Reif, J. H.; Seeman, N. C. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 1848.
- (15) Park, S. H.; Barish, R.; Li, H.; Reif, J. H.; Finkelstein, G.; Yan, H.; LaBean, T. H. *Nano Letters* **2005**, 5, 693.
- (16) Reishus, D.; Shaw, B.; Brun, Y.; Chelyapov, N.; Adleman, L. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 17590.
- (17) Ke, Y.; Liu, Y.; Zhang, J.; Yan, H. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 4414.
- (18) Mathieu, F.; Liao, S.; Kopatsch, J.; Wang, T.; Mao, C.; Seeman, N. C. *Nano Letters* **2005**, 5, 661.
- (19) Kuzuya, A.; Wang, R.; Sha, R.; Seeman, N. C. *Nano Letters* **2007**, 7, 1757.
- (20) Mitchell, J. C.; Harris, J. R.; Malo, J.; Bath, J.; Turberfield, A. J. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 16342.

- (21) Liu, H.; Chen, Y.; He, Y.; Ribbe, A. E.; Mao, C. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 1942.
- (22) Ding, B.; Sha, R.; Seeman, N. C. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 10230.
- (23) He, Y.; Chen, Y.; Liu, H.; Ribbe, A. E.; Mao, C. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12202.
- (24) He, Y.; Ye, T.; Su, M.; Zhang, C.; Ribbe, A. E.; Jiang, W.; Mao, C. *Nature* **2008**, *452*, 198.
- (25) Rothmund, P. W. K. *Nature* **2006**, *440*, 297.
- (26) Shih, W. M.; Quispe, J. D.; Joyce, G. F. *Nature* **2004**, *427*, 618.
- (27) Endo, M.; Sugita, T.; Katsuda, Y.; Hidaka, K.; Sugiyama, H. *Chemistry – A European Journal* **2010**, *16*, 5362.
- (28) Han, D.; Pal, S.; Nangreave, J.; Deng, Z.; Liu, Y.; Yan, H. *Science* **2011**, *332*, 342.
- (29) Lazerges, M.; Perrot, H.; Rabehagasoa, N.; Antoine, E.; Compere, C. *Chemical Communications* **2005**, 6020.
- (30) Waybright, S. M.; Singleton, C. P.; Wachter, K.; Murphy, C. J.; Bunz, U. H. F. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 1828.
- (31) Weizmann, Y.; Braunschweig, A. B.; Wilner, O. I.; Cheglakov, Z.; Willner, I. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 5289.
- (32) Ding, K.; Alemdaroglu, F. E.; Börsch, M.; Berger, R.; Herrmann, A. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 1172.
- (33) Shchepinov, M. S.; Mir, K. U.; Elder, J. K.; Frank-Kamenetskii, M. D.; Southern, E. M. *Nucleic Acids Research* **1999**, *27*, 3035.
- (34) Feldkamp, U.; Saccà, B.; Niemeyer, C. M. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 5996.
- (35) Lee, J. B.; Roh, Y. H.; Um, S. H.; Funabashi, H.; Cheng, W.; Cha, J. J.; Kiatwuthinon, P.; Muller, D. A.; Luo, D. *Nat Nano* **2009**, *4*, 430.
- (36) Rabe, K. S.; Niemeyer, C. M. *Nat Mater* **2009**, *8*, 370.
- (37) Lundberg, E. P.; Plesa, C.; Wilhelmsson, L. M.; Lincoln, P.; Brown, T.; Norden, B. *ACS Nano* **2011**, *5*, 7565.
- (38) Aldaye, F. A.; Sleiman, H. F. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 2204.

- (39) Aldaye, F. A.; Sleiman, H. F. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 4130.
- (40) Aldaye, F. A.; Sleiman, H. F. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 13376.
- (41) Goodman, R. P.; Schaap, I. A. T.; Tardin, C. F.; Erben, C. M.; Berry, R. M.; Schmidt, C. F.; Turberfield, A. J. *Science* **2005**, *310*, 1661.
- (42) Erben, C. M.; Goodman, R. P.; Turberfield, A. J. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 6992.
- (43) Erben, C. M.; Goodman, R. P.; Turberfield, A. J. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 7414.
- (44) Simmons, C. R.; Schmitt, D.; Wei, X. X.; Han, D. R.; Volosin, A. M.; Ladd, D. M.; Seo, D. K.; Liu, Y.; Yan, H. *ACS Nano* **2011**, *5*, 6060.
- (45) Wen, Y.; Pei, H.; Wan, Y.; Su, Y.; Huang, Q.; Song, S.; Fan, C. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 7418.
- (46) Li, D.; Song, S.; Fan, C. *Accounts of Chemical Research* **2010**, *43*, 631.
- (47) Ozhalici-Unal, H.; Armitage, B. A. *ACS Nano* **2009**, *3*, 425.
- (48) Chang, M.; Yang, C. S.; Huang, D. M. *ACS Nano* **2011**, *5*, 6156.
- (49) Aich, P.; Labiuk, S. L.; Tari, L. W.; Delbaere, L. J. T.; Roesler, W. J.; Falk, K. J.; Steer, R. P.; Lee, J. S. *Journal of Molecular Biology* **1999**, *294*, 477.
- (50) Wettig, S. D.; Wood, D. O.; Lee, J. S. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2003**, *94*, 94.
- (51) Aldaye, F. A.; Sleiman, H. F. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 10070.
- (52) Muller, J. *Nature* **2006**, *444*, 698.
- (53) Tanaka, K.; Shionoya, M. *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64*, 5002.
- (54) Tanaka, K.; Tengeiji, A.; Kato, T.; Toyama, N.; Shionoya, M. *Science* **2003**, *299*, 1212.
- (55) Clever, G. H.; Polborn, K.; Carell, T. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 7204.
- (56) Rühl, T.; Stulz, E. *Supramolecular Chemistry* **2010**, *22*, 103.
- (57) Wirges, C. T.; Timper, J.; Fischler, M.; Sologubenko, A. S.; Mayer, J.; Simon, U.; Carell, T. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 219.

- (58) Börjesson, K.; Wiberg, J.; El-Sagheer, A. H.; Ljungdahl, T.; Martensson, J.; Brown, T.; Nordén, B.; Albinsson, B. *ACS Nano* **2010**, *4*, 5037.
- (59) Vargas-Baca, I.; Mitra, D.; Zulyniak, H. J.; Banerjee, J.; Sleiman, H. F. *Angewandte Chemie* **2001**, *113*, 4765.
- (60) Mitra, D.; Di Cesare, N.; Sleiman, H. F. *Angewandte Chemie* **2004**, *116*, 5928.
- (61) Stewart, K. M.; McLaughlin, L. W. *Chemical Communications* **2003**, 2934.
- (62) Ghosh, S.; Pignot-Paintrand, I.; Dumy, P.; Defrancaq, E. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, *7*, 2729.
- (63) Göritz, M.; Krämer, R. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 18016.
- (64) Choi, J. S.; Kang, C. W.; Jung, K.; Yang, J. W.; Kim, Y.-G.; Han, H. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 8606.
- (65) Yang, H.; Sleiman, H. F. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 2443.
- (66) Gothelf, K. V.; Thomsen, A.; Nielsen, M.; Cló, E.; Brown, R. S. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 1044.
- (67) Stewart, K. M.; McLaughlin, L. W. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 2050.
- (68) Stewart, K. M.; Rojo, J.; McLaughlin, L. W. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 5808.

Chapitre 2

Synthèse de molécules hybrides Complexe de ruthénium/Oligonucléotide

Chapitre 2

Synthèses de molécules hybrides Complexe de Ruthénium – Oligonucléotides

1. Introduction

1.1. Stratégies de synthèses

Deux stratégies de synthèses ont été développées pour former les éléments d'assemblage composés d'un complexe de ruthénium et d'ODNs. La première voie de synthèse envisagée utilise une réaction d'amidation, communément appelée « couplage peptidique ». Elle induit la formation d'un lien amide entre le complexe métallique et l'oligonucléotide. Le deuxième schéma de synthèse utilise la réaction de cycloaddition 1,3 catalysée au cuivre de Huisgen et il conduit à la formation d'un lien 1,2,3-triazole entre les deux éléments.

1.1.1. Réaction d'amidation

La première voie de synthèse envisagée est la formation d'un amide entre le complexe de ruthénium et l'ODN à partir d'une fonction amine et d'une fonction acide carboxylique par déshydratation. Le monde biologique utilise cette synthèse pour lier les peptides, d'où son nom de synthèse ou liaison peptidique. Le choix de cette réaction d'amidation (ou acylation) a été motivée par le fait qu'elle est simple à mettre en œuvre et efficace.^{1,2}

Elle est indépendante des substituants des fonctions. Les fonctions acide carboxylique et amine pouvaient donc être positionnées aussi bien sur le complexe de ruthénium que sur l'ODN. Néanmoins, la molécule 4,4'-biscarboxy-2,2'-bipyridine et les oligonucléotides fonctionnalisés par une fonction amine en position 5'-étant disponibles commercialement, nous avons choisi de synthétiser le lien amide à partir de ces composés (Figure 1). La stratégie a donc consisté à obtenir, à partir du ligand commercial 4,4'-biscarboxy-2,2'-bipyridine, le complexe de ruthénium $[\text{Ru}(4,4'\text{-biscarboxy-2,2'-bipyridine})(2,2'\text{-bipyridine})_2](\text{PF}_6)_2$; et ensuite d'effectuer le couplage entre ce complexe et l'ODN fonctionnalisé par une hexylamine en position 5'-. Cette voie de synthèse nous a permis d'obtenir des complexes de ruthénium mono et bis substitués par des oligonucléotides.

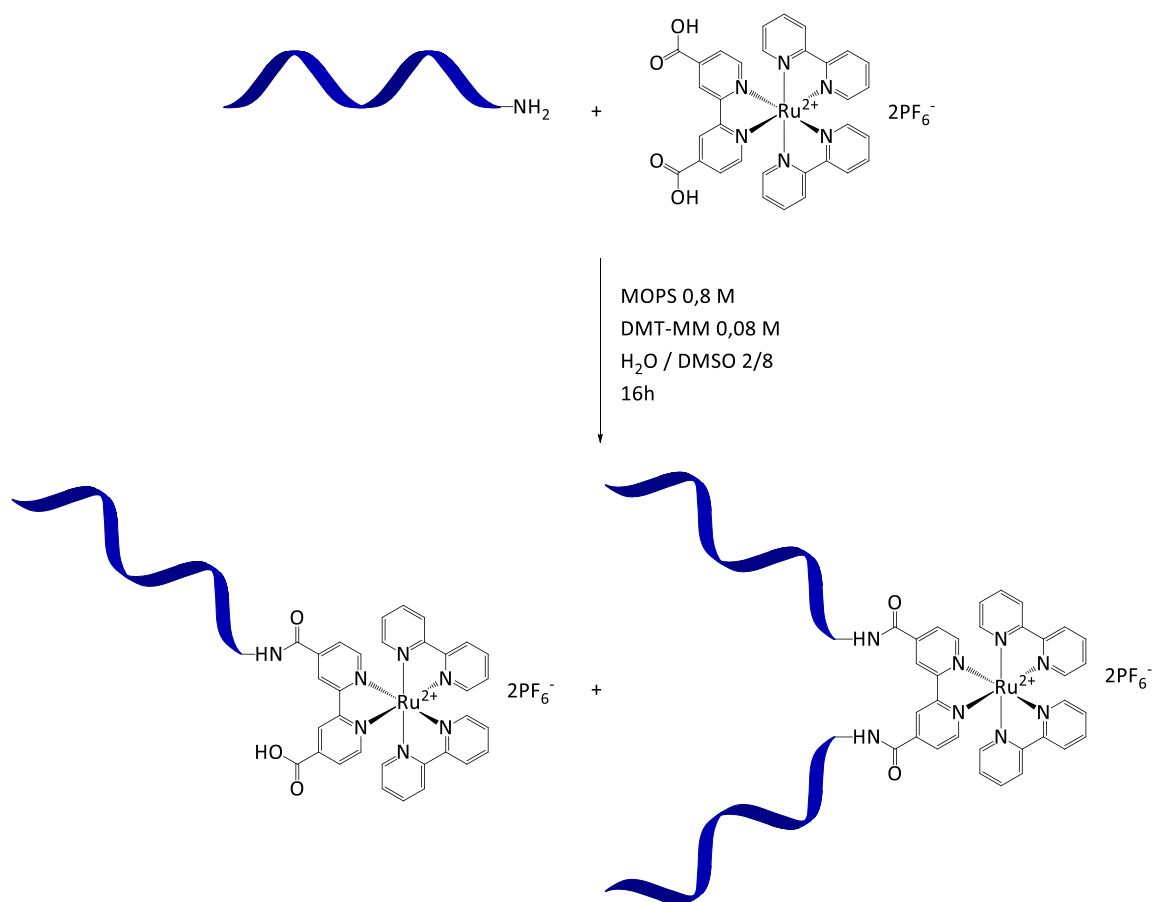


Figure 1 – Synthèse par amidation de molécules hybrides formées d'un complexe de ruthénium lié à un ou deux oligonucléotides.

1.1.2. Réaction de Click chemistry

La deuxième stratégie de synthèse envisagée a été d'utiliser la réaction de click chemistry pour coupler les oligonucléotides au complexe de ruthénium.

La *click chemistry* n'est pas une réaction à proprement parler, mais plutôt un concept proposé par Sharpless et al.³ en 2001. Ce concept dépeint la *click chemistry* comme étant une réaction permettant de former une structure par l'assemblage de plus petites entités. D'après les auteurs, la réaction chimique employée doit être modulaire, avoir un haut rendement, des sous-produits de réaction non gênants et ne doit pas nécessiter de purification chromatographique. Ce concept peut s'appliquer à de nombreuses réactions (réactions thiol-ène, Diels Alder), mais une réaction est depuis assimilée à la *click chemistry* : la version catalysée au cuivre (I) de la cycloaddition de Huisgen sur une fonction alcyne et une fonction

azoture (CuAAC de l'anglais *Copper-catalyzed Alkyne Azide Cycloaddition*). C'est cette réaction que nous avons utilisée au cours de ce projet et qui nous a permis d'envisager la liaison du complexe de ruthénium avec des ODNs de deux façons différentes. En effet, comme le montre la Figure 2, les fonctions réactives, un alcyne et un azoture, peuvent être portées par le complexe de ruthénium comme par les ODNs. Ces deux stratégies de synthèse ont été développées et ont nécessité la formation de complexes de ruthénium et d'oligonucléotides fonctionnalisés soit par des alcynes, soit par des azotures.

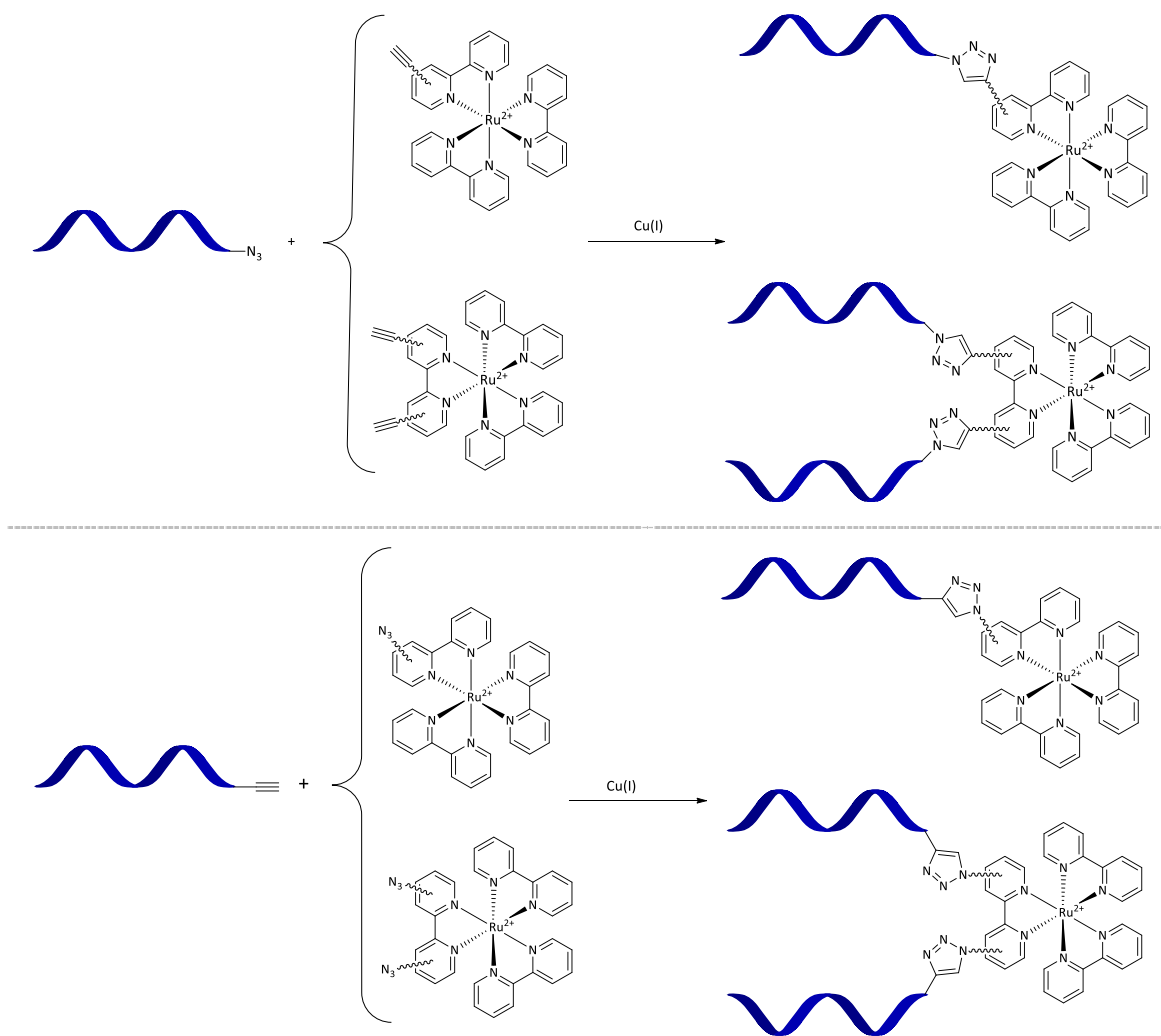


Figure 2 – *Click Chemistry* générale entre un ODN et un complexe de ruthénium.

La synthèse des molécules hybrides Complexe de Ruthénium-ODNs par les deux voies de synthèse choisies a donc nécessité la synthèse de complexes de ruthénium fonctionnalisés par des acides carboxyliques, des alcynes ou des azotures, et l'utilisation d'oligonucléotides possédant une fonction amine, alcyne ou azoture en position 5'.

2. Synthèse des complexes de ruthénium

Au cours de ce projet, trois types de complexes de ruthénium ont été synthétisés. Ils comportent respectivement des fonctions acide carboxylique pour le couplage peptidique et des fonctions alcyne ou azoture pour le couplage par click chemistry.

2.1. Complexe de ruthénium fonctionnalisé par des fonctions acide carboxylique

Le complexe de ruthénium portant deux fonctions acides carboxyliques **2** a été synthétisé en une étape à partir du ligand commercial **1**. Il a été obtenu avec un rendement de 48 % à partir du précurseur $\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2$ et du composé 4,4'-biscarboxy-2,2'-bipyridine **1** dans un mélange eau/méthanol dans des proportions 3/1 à reflux pendant 10 h en présence de NaHCO_3 (Figure 3).⁴ Le produit a été précipité par ajout de KPF_6 à froid et purifié par chromatographie sur colonne d'alumine neutre.

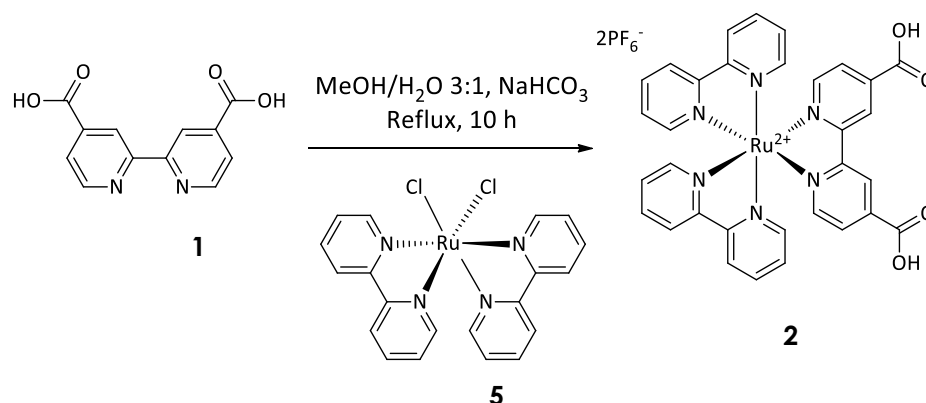


Figure 3 – Synthèse du complexe $[\text{Ru}(4,4'\text{-biscarboxy-2,2'-bipyridine})(2,2'\text{-bipyridine})_2](\text{PF}_6)_2$ **2**.

2.2. Complexes de ruthénium fonctionnalisés par des alcynes

Le composé de départ est le réactif 4,4'-bisméthyl-2,2'-bipyridine **3**. Par une lithiation suivie d'une substitution par le 3-bromo-1-(triméthylsilyl)prop-1-yne, la bipyridine est substituée avec deux fonctions alcyne protégées par des triméthylsilylanes.⁵ Après purification par chromatographie flash sur colonne de silice, le ligand **4** est obtenu avec un rendement de 51 %. Il est ensuite complexé au $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipyridine})_2]\text{Cl}_2$ **5** dans l'éthanol à reflux pour former le complexe de ruthénium trisbipyridine bis-fonctionnalisé **6**. Le produit est purifié par HPLC et obtenu avec un

rendement de 94 %. La déprotection des fonctions alcyne avec une solution d'hydroxyde de sodium dans le méthanol a permis d'obtenir le complexe **7** attendu portant deux fonctions alcyne avec un rendement de 75 % (Figure 4).

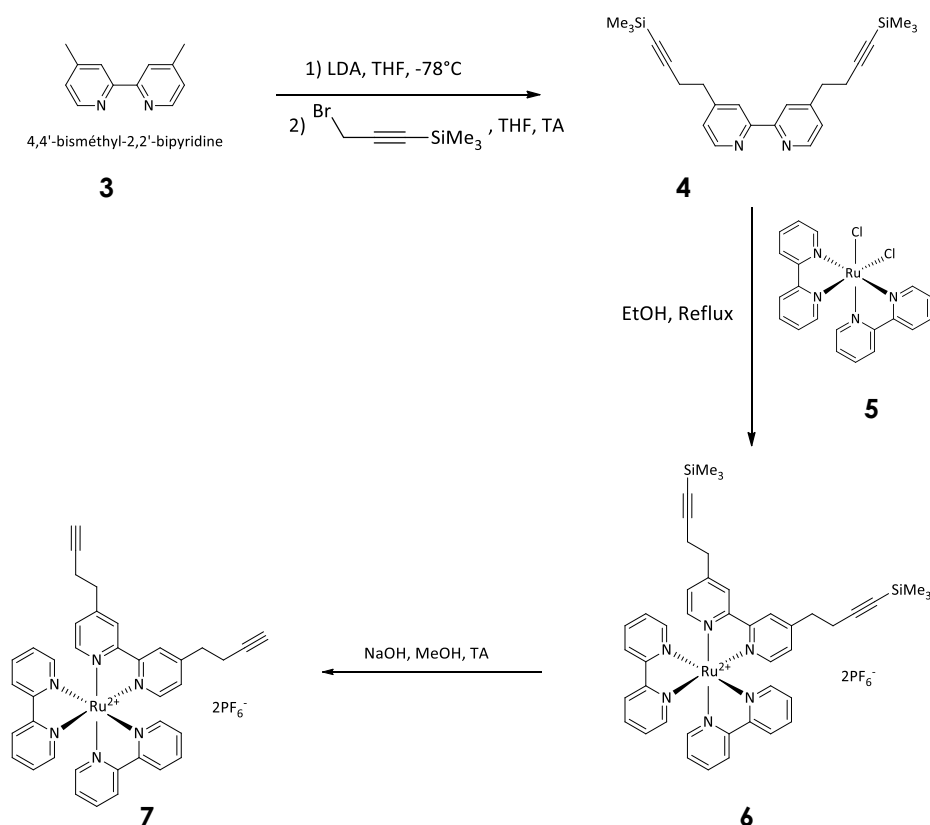


Figure 4 – Synthèse du complexe de ruthénium bis-substitué par des fonctions alcyne **7**.

Un complexe de ruthénium fonctionnalisé par trois bipyridines identiques a aussi été réalisé. À partir du composé **4** précédemment synthétisé et du précurseur Ru(DMSO)₄Cl₂, le complexe de ruthénium portant six fonctions alcynes protégées **8** a été obtenu avec un rendement de 75 %. La déprotection des fonctions alcyne par une solution de NaOH dans le méthanol a permis d'obtenir le composé **9** avec un rendement de 95 % (Figure 5).

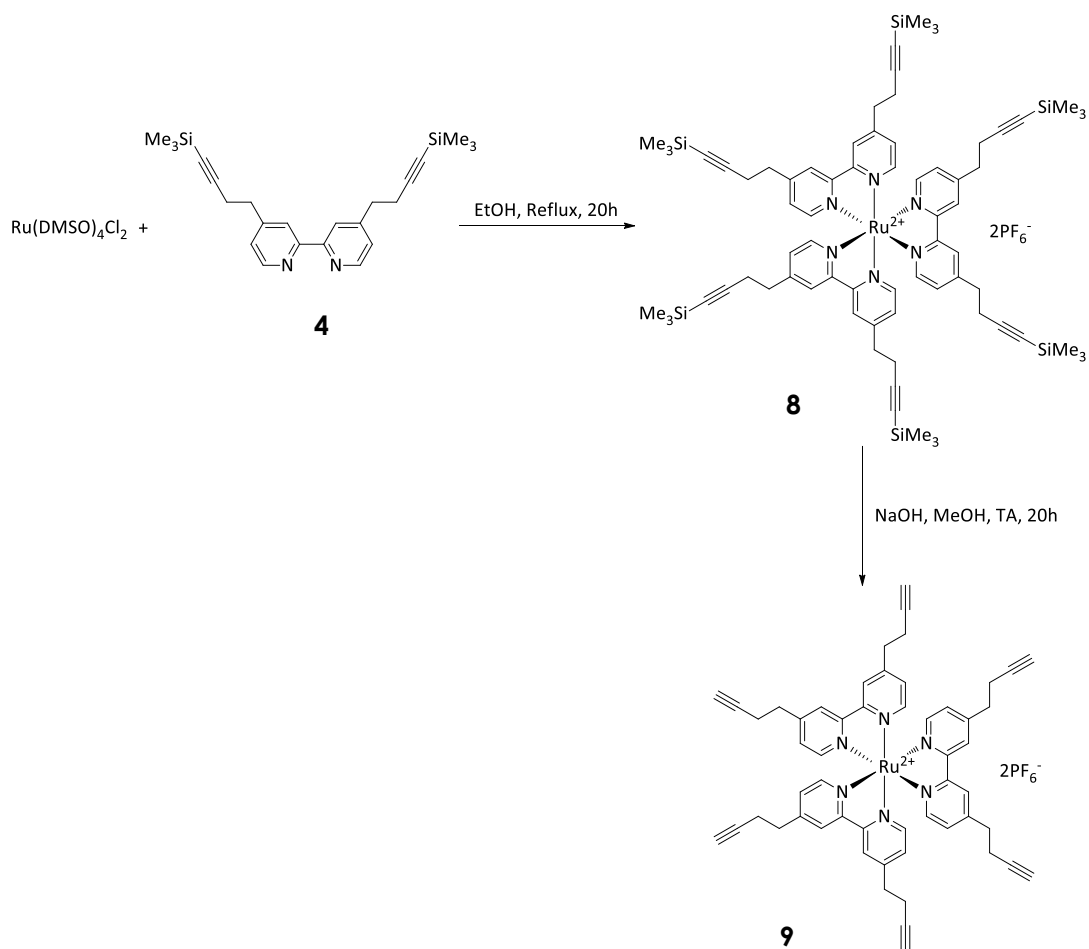


Figure 5 - Synthèse du complexe de ruthénium hexa-substitué par des fonctions alcyne **9**.

Le complexe de ruthénium tétra substitué **12** a été obtenu par le biais d'une complexation en deux étapes. La première étape met en présence le précurseur de ruthénium $\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2$, deux équivalents de la bipyridine bis substituée protégée **4**, du LiCl et de l'hydroquinone dans un mélange diméthoxyéthane/méthanol 1:2 sous atmosphère inerte afin de former le complexe ruthénium bisbipyridine bis-chlorure **10**. Après extraction, séchage et évaporation, le produit brut subit une deuxième étape consistant à complexer le ligand 2,2'-bipyridine. La purification du complexe **11** est effectuée par HPLC. La déprotection des fonctions alcyne est ensuite effectuée de la même façon que précédemment à l'aide d'hydroxyde de sodium dans du méthanol pour obtenir le complexe attendu **12** avec un rendement de 75 % (Figure 6).

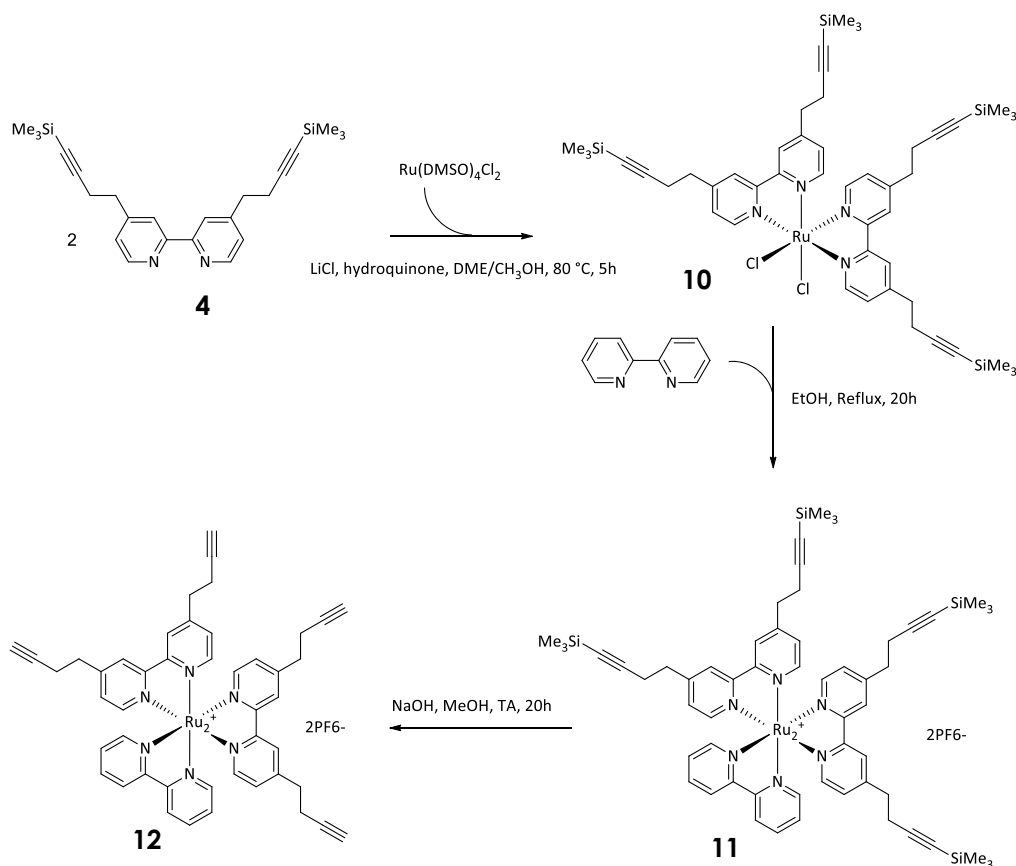


Figure 6 – Synthèse du complexe de ruthénium tétra-substitué par des fonctions alcyne 12.

Les synthèses décrites nous ont donc permis d'obtenir trois complexes de ruthénium **7**, **8** et **9** fonctionnalisés respectivement par deux, quatre et six fonctions alcyne.

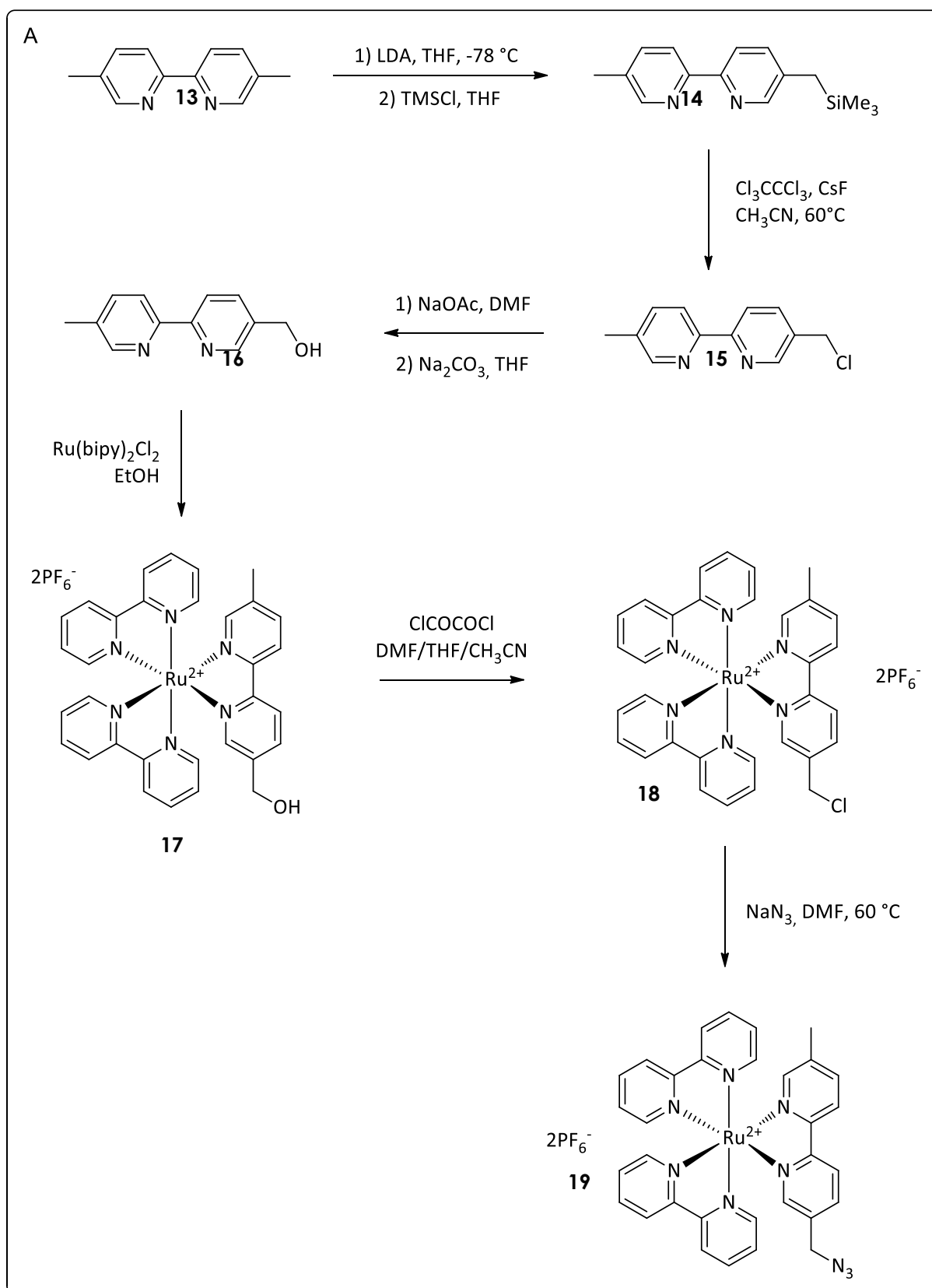
2.3. Complexes de ruthénium fonctionnalisés par des fonctions azoture

Plusieurs voies de synthèse ont été développées au cours de ce travail pour obtenir des complexes de ruthénium substitués par des fonctions azoture. Ce paragraphe va traiter de ces différentes stratégies.

2.3.1. Première stratégie de synthèse

La première stratégie de synthèse développée consistait à synthétiser un ligand 2,2-bipyridine portant une ou deux fonctions alcool, à former les complexes de ruthénium tris-bipyridine correspondants et en deux autres étapes à introduire la ou les fonctions azoture sur celui-ci (Figure 7). Pour cela, deux ligands 2,2'-bipyridine fonctionnalisés par des méthyles en positions 4,4' (**3**) ou en positions 5,5' (**13**) ont été utilisés. En effet, lors de la première étape de synthèse qui consiste en

l'introduction de fonctions triméthylsilane par lithiation et réaction avec du chlorure de triméthylsilane, il est possible d'obtenir sélectivement une monosubstitution à partir du dérivé 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridine **13** et une bis-substitution avec le dérivé 4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine **3**.^{6,7} La première étape a donc consisté à faire réagir le composé **13** et **3** avec du diisopropylamidure de lithium (LDA) dans du THF à -78 °C, puis à ajouter du chlorure de triméthylsilane pour obtenir respectivement la molécule mono-sustituée **14** et bis-sustituée **20**. L'ajout d'hexachloroéthane en présence de fluorure de césium dans l'acétonitrile permet de substituer le ou les groupements triméthylsilyle par un ou deux chlorures et obtenir respectivement les molécules **15** et **21**. L'étape suivante est la substitution des chlorures par des hydroxyles. Pour cela, un dérivé acétate intermédiaire est formé à l'aide d'acétate de sodium puis les fonctions alcool sont déprotégées avec une solution de carbonate de sodium. Après purification par chromatographie sur colonne de silice pour le composé **16** et sur colonne d'alumine neutre pour le composé **22**, les produits sont obtenus avec des rendements de l'ordre de 70 %. Les ligands substitués par les fonctions hydroxyle sont ensuite complexés avec Ru(2,2'-bipyridine)₂Cl₂ **5** dans l'éthanol à reflux. Les complexes de ruthénium **17** et **23** sont obtenus avec des rendements supérieurs à 80%. Ces derniers mis en présence de chlorure d'oxalyle dans l'acétonitrile permettent d'obtenir les complexes de ruthénium **18** et **24** fonctionnalisés respectivement par une et deux fonctions chlorure. La dernière étape est la substitution des fonctions chlorure par des fonctions azoture sur les complexes de ruthénium. En présence de NaN₃ et de NaI dans le DMF, le complexe de ruthénium monosubstitué **18** a donné le produit attendu **19** après purification par chromatographie sur colonne de silice avec un rendement de 40 %. Dans le cas du complexe bis-substitué **24**, le produit attendu **25** n'a pas été isolé.



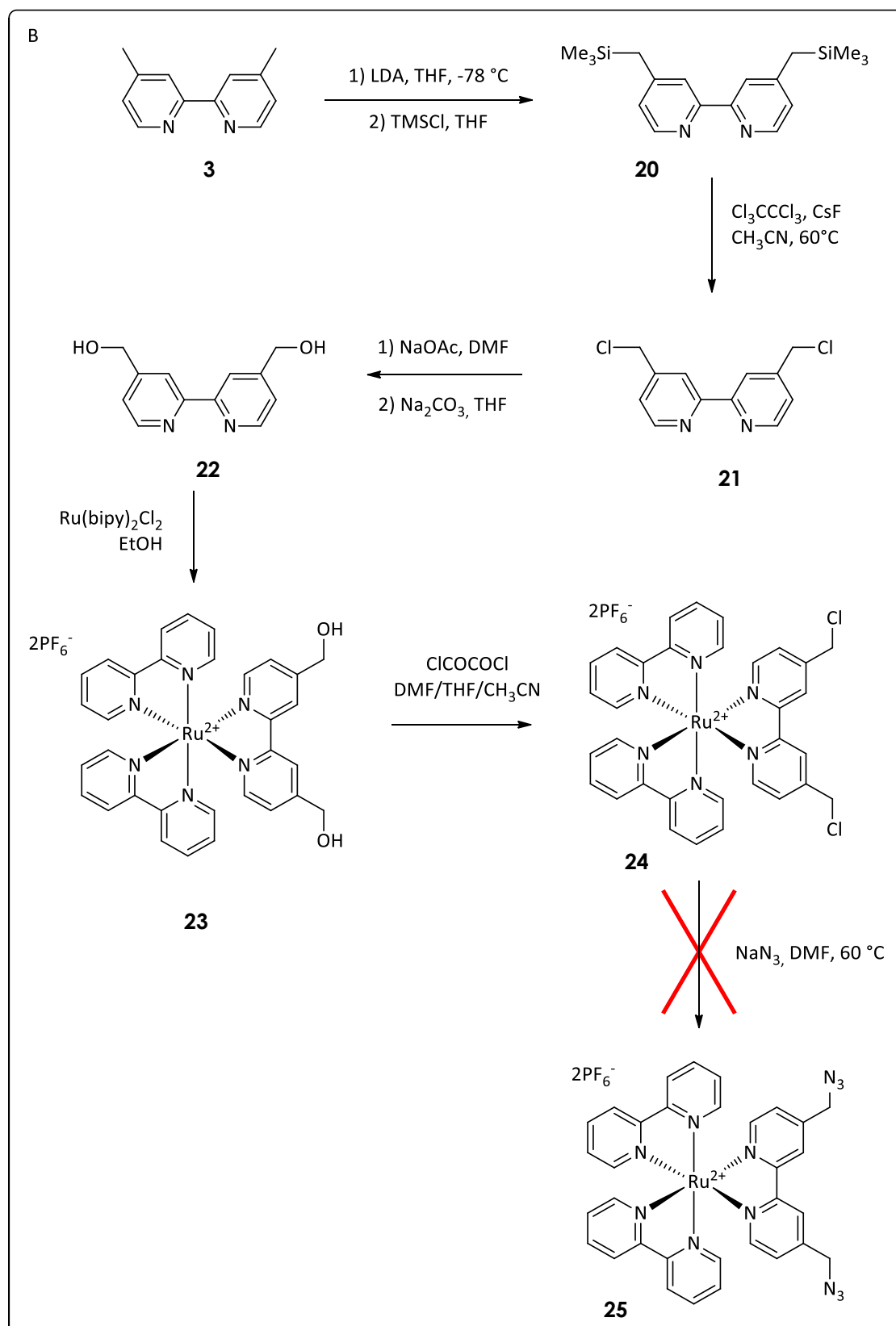


Figure 7 - Première stratégie de synthèse : complexation de ligands bipyridine fonctionnalisés par des chlorures et substitutions des complexes par des azotures.

Cette première stratégie de synthèse nous a permis d'obtenir un premier complexe de ruthénium fonctionnalisé par une fonction azoture, le complexe **19**. Afin d'obtenir des complexes de ruthénium avec deux fonctions azoture, deux autres voies de synthèse ont été développées.

2.3.2. Deuxième stratégie de synthèse

La deuxième stratégie de synthèse envisagée pour obtenir un complexe de ruthénium fonctionnalisé par deux fonctions azoture a consisté à partir du complexe métallique **2** précédemment décrit. La synthèse est réalisée en 2 étapes (Figure 8). La première étape consiste à former le chlorure d'acyle des fonctions acide carboxylique par réaction du complexe de ruthénium **2** avec du chlorure de thionyle dans l'acétonitrile à température ambiante. La deuxième étape est celle de substitution des chlores par la 3-azido-1-propanamine en présence de triéthylamine dans l'acétonitrile. La molécule cible **26** est purifiée par chromatographie flash sur colonne de silice et obtenue avec un rendement de 43 %.

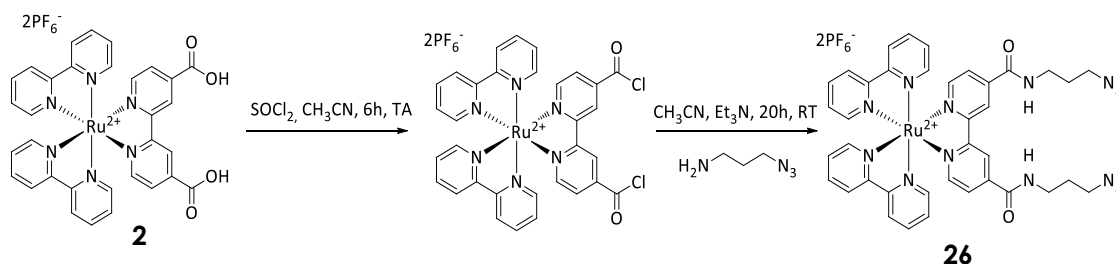


Figure 8 – Formation du complexe de ruthénium fonctionnalisé par deux fonctions azoture par formation d'une liaison amide.

2.3.3. Troisième stratégie de synthèse

La dernière voie de synthèse développée a aussi conduit à la formation d'un complexe de ruthénium portant deux fonctions azoture. Pour cela, nous sommes partis du complexe métallique bis-alcyne **7** et nous avons utilisé la réaction de click chemistry catalysée au cuivre pour y introduire les groupes azoture. En présence de CuSO_4 , de Na-L-ascorbate et d'un très large excès de 1,5-diazidopentane, le complexe de ruthénium **7** a été transformé par une double réaction de CuAAC en molécule **27** présentant deux fonctions azoture (Figure 9). Le composé a été purifié par chromatographie sur colonne de silice et isolé avec un rendement de 34 %.

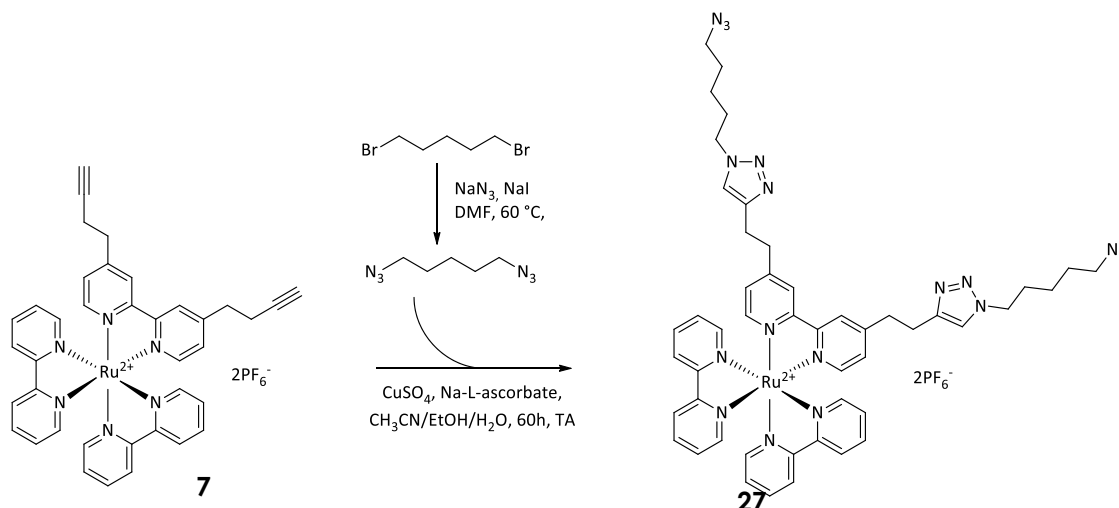


Figure 9 - Synthèse d'un complexe de ruthénium fonctionnalisé par des azotures.

Au travers de ces différentes stratégies de synthèse, trois complexes de ruthénium fonctionnalisés par une ou deux fonctions azoture ont été obtenus.

La première stratégie nous a permis d'atteindre spécifiquement un complexe de ruthénium fonctionnalisé par un seul azoture **19**. Les deux stratégies suivantes ont consisté à utiliser les complexes de ruthénium fonctionnalisés par deux groupements acide carboxylique **2** ou par deux groupements alcyne **7** pour obtenir des complexes de ruthénium bis-fonctionnalisés par des azotures **26** et **27**. Pour cela, l'insertion des deux fonctions azoture a été réalisée en utilisant soit une double réaction d'amidation avec la formation de liens amide, soit une double réaction de CuAAC avec la création de noyaux triazoles.

3. Les oligonucléotides fonctionnalisés

Trois types d'oligonucléotides modifiés ont été nécessaires au projet : des ODNs portant une fonction amine pour la réaction d'amidation et alcyne ou azoture pour la réaction de click chemistry. Toutes les modifications ont été insérées en position 5' des séquences et avec un espaceur de 4 à 6 carbones.

3.1. Fonctionnalisation par un groupement amine

Les oligonucléotides fonctionnalisés par un aminohexyle en position 5' - sont commerciaux. Nous les avons achetés avec l'hexylamine terminale protégée par un groupement monométhoxytrityle (MMT), conservés sur support solide et avec les bases nucléiques toujours protégées.

En effet, nous avons décidé de réaliser le couplage entre les ODNs et le complexe de ruthénium **2** sur support solide en nous appuyant sur des exemples de la littérature montrant une plus grande efficacité de la réaction sur support solide qu'en solution.^{8,9}

La première étape consiste à déprotéger la fonction amine terminale en éliminant le groupe protecteur MMT. Ce groupe a la particularité de pouvoir se couper selon un protocole spécifique (acide trichloroacétique à 3 % dans le dichlorométhane) qui déprotège uniquement l'amine terminale tout en laissant protégées les autres fonctions amines des bases de la séquence (Figure 10).

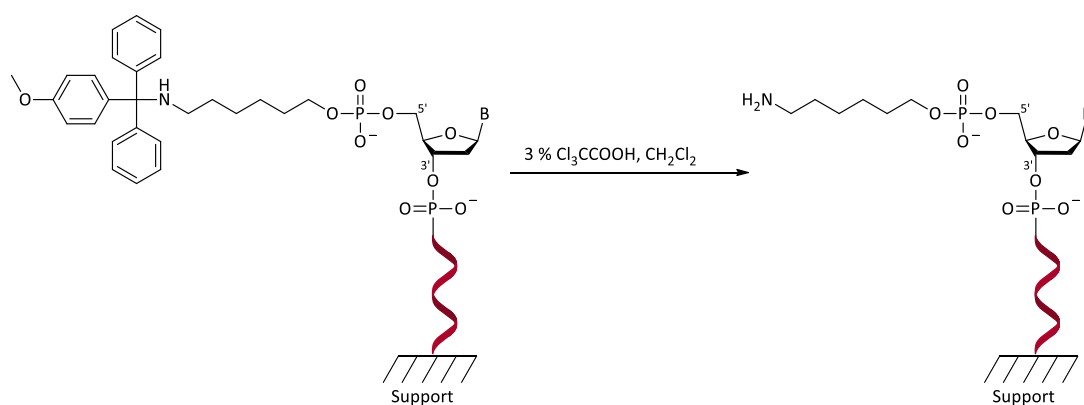


Figure 10 – Base nucléique modifiée par un amino-hexane protégé sur la position 5'

Huit séquences oligonucléotides sur support solide, possédant de 14 à 58 nucléotides et fonctionnalisées par un hexylamine en position 5'- ont été utilisées dans ce projet. Elles sont données dans la Table 1.

Séquence	Nombre de nucléotides	Séquences
1	14	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -AGG TCT TCA GTA CG-3'
2	14	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -CGT ACT GAA GAC CT-3'
3	20	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -GAG ACT CGA CGC TGC ATG AG-3'
4	20	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -CTC ATG CAG CGT CGA GTC TC-3'
5	24	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -GTA GCA AGC CTG CCT CTG AGT CCG-3'
6	24	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -CGG ACT CAG AGG CAG GCT TGC TAC-3'
7	34	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -CGT ACT GAA GAC CT CTC ATG CAG CGT CGA GTC TC-3'
8	58	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -CGT ACT GAA GAC CT CTC ATG CAG CGT CGA GTC TC GTA GCA AGC CTG CCT CTG AGT CCG-3'

Table 1 - Séquences nucléotidiques fonctionnalisées par un aminohexyle en position 5'-.

3.2. Fonctionnalisation par un groupement alcyne

Les séquences nucléiques portant une fonction hexyne en position 5'- proviennent de deux sources. La première est issue d'une collaboration avec l'équipe de J.M. Escudier du laboratoire SPCMIB¹ et qui nous a permis d'obtenir la séquence modifiée **9**. La deuxième est une source commerciale. Quatre séquences ont été utilisées et sont indiquées dans la Table 2.

Séquence	Nombre de nucléotides	Séquences
9	14	5'-HC≡C(CH ₂) ₄ -GCA TGA CTT CTG GA-3'
10	14	5'-HC≡C(CH ₂) ₄ -TCC AGA AGT CAT GC-3'
5a	24	5'-HC≡C(CH ₂) ₄ -GTA GCA AGC CTG CCT CTG AGT CCG-3'
6a	24	5'-HC≡C(CH ₂) ₄ -CGG ACT CAG AGG CAG GCT TGC TAC-3'

Table 2 - Séquences fonctionnalisées par une fonction hexyne en position 5'-.

¹ Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique, équipe MoNA (Modified Nucleic Acids).

3.3. Fonctionnalisation par un groupement azoture

La fonctionnalisation d'un oligonucléotide par une fonction azoture a été possible grâce à la modification d'une thymine sur son carbone 5' par un 5-bromo-pent-2-ène, modification effectuée par l'équipe de J.-M. Escudier.¹⁰ Cette modification de la base nucléique a permis la synthèse d'une séquence nucléique possédant une fonction bromée en fin de chaîne.

Encore sur le support, la séquence est mise en présence de NaN₃ et de NaI dans du DMF anhydre pendant 1h15 à 65 °C pour effectuer la substitution du bromure par l'azoture.^{11,12} Après déprotection et clivage du support, la séquence a été purifiée en HPLC préparative (Figure 11 et séquence en Table 3).

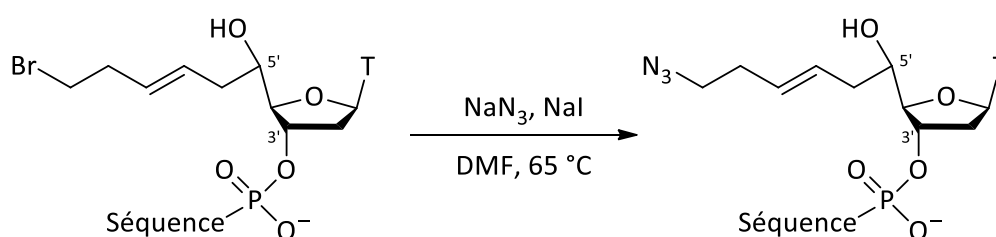


Figure 11 - Modification d'une base nucléique par un 5-azidopent-2-ényle.

Séquence	Nombre de nucléotides	Séquences
11	15	5'-N ₃ C ₂ H ₈ -TTC CAG AAG TCA TGC-3'

Table 3 – Séquence nucléotidique fonctionnalisée par une fonction azoture en position 5'-.

4. Synthèses des briques d'assemblage Ru-ODN

Deux stratégies de synthèse ont été envisagées pour lier les complexes de ruthénium et les simples brins d'ADN : le couplage peptidique et la réaction de click chemistry catalysée au cuivre. Comme nous l'avons vu précédemment, nous disposons des différentes molécules fonctionnalisées pour réaliser ces couplages : les ODNs possédant une amine en position 5'- et le complexe de ruthénium fonctionnalisé par deux acides carboxyliques **2** ; les ODNs fonctionnalisés par un alcyne ou un azoture et les complexes de ruthénium **7**, **9** et **12** fonctionnalisés par des alcynes ou ceux fonctionnalisés par des azotures **19**, **26** et **27**.

4.1. Synthèses par une réaction d'amidation

4.1.1. Synthèses

Le mécanisme de la réaction d'amidation utilise un acide carboxylique et une amine pour former un amide par déshydratation. La réaction n'est toutefois pas efficace et nécessite la formation de l'ester activé de l'acide carboxylique. Le N-hydroxysuccinimide (NHS) est probablement le plus connu des activateurs, mais d'autres molécules peuvent servir à la formation de l'ester activé.¹³ Avec des oligonucléotides, le 4-(4,6-Diméthoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-méthylmorpholinium (DMT-MM) est probablement le plus intéressant des agents d'acylation et c'est celui que nous avons décidé d'utiliser.¹⁴ Son mécanisme d'action est décrit dans la Figure 12.

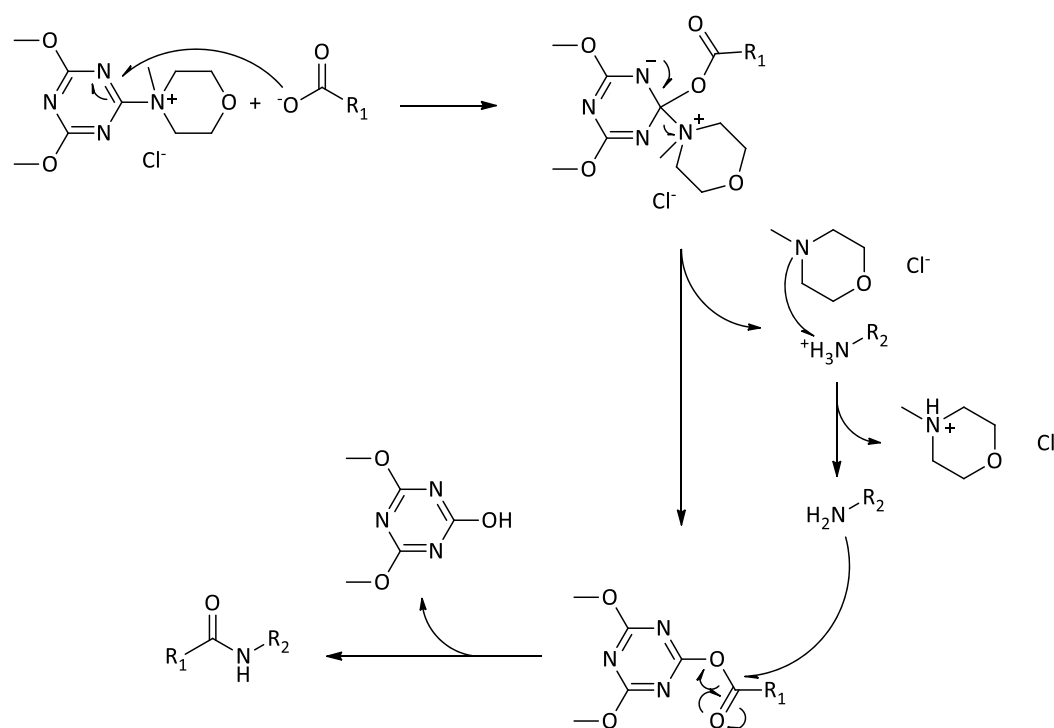


Figure 12 – Mécanisme de la réaction d'amidation activée par le DMT-MM.

Le couplage du complexe de ruthénium **2** fonctionnalisé par deux acides carboxyliques et des ODNs fonctionnalisés par une hexylamine en position 5'- est réalisé en milieu hétérogène. En effet les séquences d'oligonucléotides sont conservées sur support solide. La réaction est effectuée en milieu tamponné par l'acide 3-(N-morpholino)propane-sulfonique (MOPS, 0,8 mol.L⁻¹, pH = 7,2) en présence de l'agent d'activation DMT-MM (0,08 mol.L⁻¹) et 25 équivalents de complexes de ruthénium **2** par cartouche d'oligonucléotides modifiés de 200 nmol dans un mélange 4/2 DMSO/H₂O (Figure 13). Après 48 h de réaction, filtration et rinçage des

billes, les oligonucléotides sont décrochés du support et déprotégés dans une solution d'ammoniaque à 55 °C. La purification est réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) à 20% dans des conditions dénaturantes.

Pour chaque réaction, deux produits de couplage ont été extraits des gels et caractérisés. Ils correspondent aux complexes de ruthénium fonctionnalisés par un (**Xm**) ou deux (**Xb**) oligonucléotides (Figure 13).

La nomenclature suivante sera utilisée tout au long du manuscrit pour nommer les briques d'assemblage Ru-ODN. **Xm** et **Xb** décriront respectivement les complexes mono- et bis-substitués avec X le numéro de la séquence et m et b pour signifier la présence de un et deux ODNs.

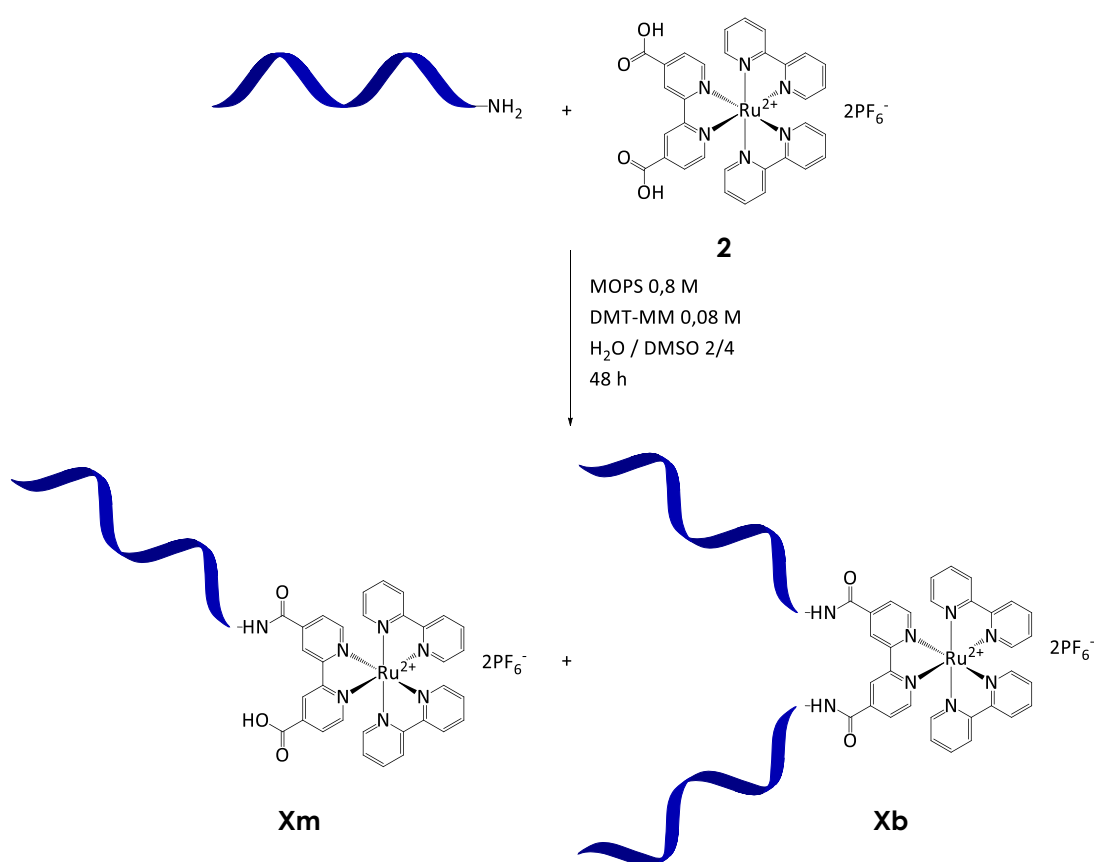


Figure 13 – Synthèse des complexes de ruthénium hybrides ODN mono-substitués (**Xm**) et bis-substitués (**Xb**) par réaction d'amidation.

4.1.2. Caractérisation

Les briques d'assemblage hybrides Ruthénium-ODNs ont été purifiées et caractérisées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

L'analyse des gels de polyacrylamide est réalisée en déposant le gel sur une plaque de silice et en l'observant par illumination avec une lampe UV aux longueurs d'onde $\lambda = 254\text{nm}$ et $\lambda = 365\text{nm}$. Ces deux longueurs d'onde permettent de discriminer les oligonucléotides couplés au complexe de ruthénium. En effet, seules les molécules hybrides Ruthénium-ODN absorbent à $\lambda = 365\text{nm}$. Nous avons aussi utilisé la table d'illumination Safe Imager™ 2.0 blue light transilluminator qui met en évidence la présence d'un complexe de ruthénium sur la séquence ODN par l'observation d'une bande rouge.

Un exemple de gel de polyacrylamide de purification est donné à la Figure 14. Il s'agit de la purification du couplage du complexe de ruthénium **2** avec la séquence ODN **2** (Table 1). Trois bandes principales sont observables. La bande migrant la plus vite correspond à l'ODN **2** n'ayant pas réagi. La deuxième bande est le complexe métallique mono-substitué par un oligonucléotide **2m**. La bande migrant le moins correspond au complexe de ruthénium fonctionnalisé par deux simples brins ADN **2b**.

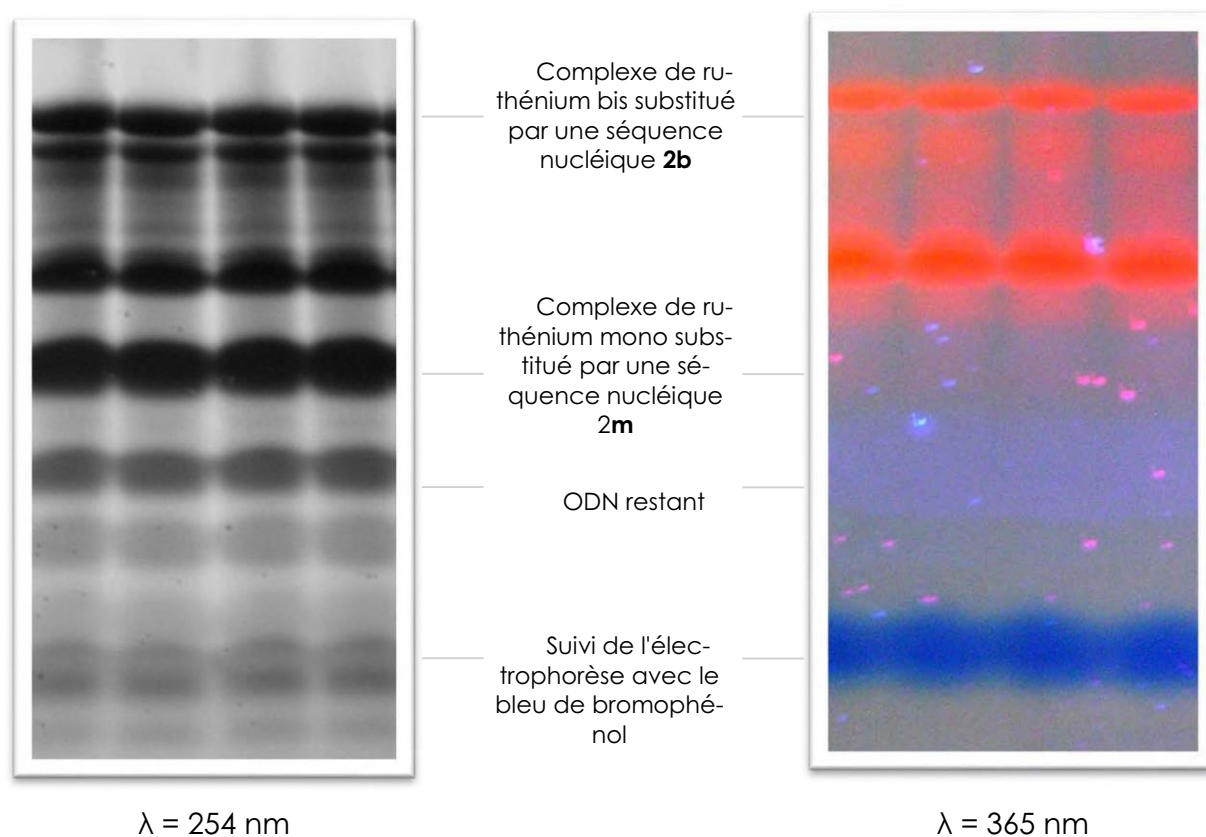
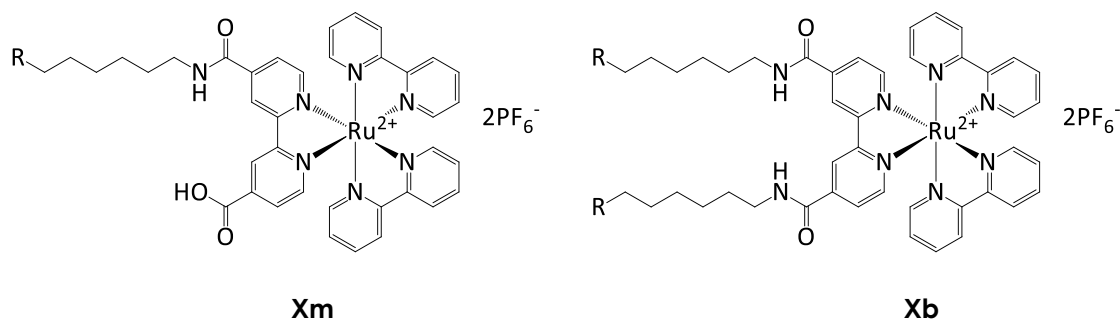


Figure 14 – Electrophorèse de purification sur gel de polyacrylamide 20% en conditions dénaturantes à $\lambda = 254 \text{ nm}$ (gauche) et $\lambda = 365\text{nm}$ (droite) de **2m et **2b**.**

En utilisant les mêmes conditions opératoires décrites au paragraphe précédent, nous avons synthétisé une nouvelle famille de complexes de ruthénium fonctionnalisés par une ou deux séquences d'oligonucléotides. La longueur des séquences varie de 14 à 58 nucléotides (Table 4).

Sur la Figure 15, les objets servant à la construction d'assemblages linéaires décrits dans le chapitre suivant ont été rassemblés sur le même gel de polyacrylamide.



X	Nombre de bases	R
1	14	5'-AGG TCT TCA GTA CG-3'
2	14	5'-CGT ACT GAA GAC CT-3'
3	20	5'-GAG ACT CGA CGC TGC ATG AG-3'
4	20	5'-CTC ATG CAG CGT CGA GTC TC-3'
5	24	5'-GTA GCA AGC CTG CCT CTG AGT CCG-3'
6	24	5'-CGG ACT CAG AGG CAG GCT TGC TAC-3'
7	34	5'-CGT ACT GAA GAC CT CTC ATG CAG CGT CGA GTC TC-3'
8	58	5'-CGT ACT GAA GAC CT CTC ATG CAG CGT CGA GTC TC GTA GCA AGC CTG CCT CTG AGT CCG-3'

Table 4 – Briques d'assemblage hybrides ruthénium/ODN et leurs séquences d'oligonucléotides correspondantes.

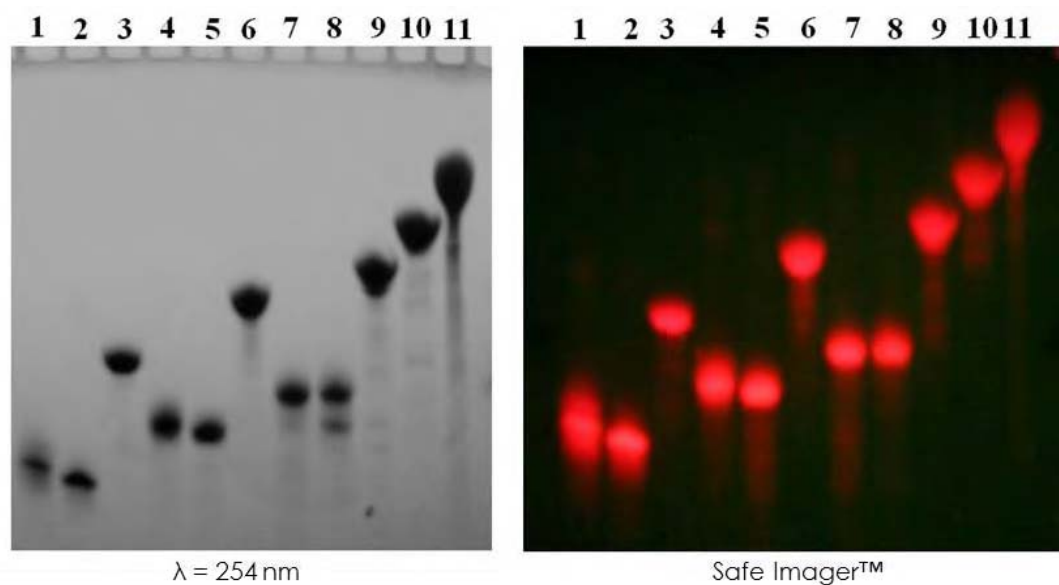


Figure 15 – Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 20% en conditions dénaturantes à $\lambda = 254\text{nm}$ (gauche) et sur Safe Imager (droite). Ligne 1 : 1m ; ligne 2 : 2m ; ligne 3 : 2b ; ligne 4 : 3m ; ligne 5 : 4m ; ligne 6 : 4b ; ligne 7 : 5m ; ligne 8 : 6m ; ligne 9 : 6b ; ligne 10 : 7b ; ligne 11 : 8b.

Ces produits ont été caractérisés par spectrométries UV-Visible et de Fluorescence et par spectrométrie de masse *electrospray* haute résolution.

Les spectres d'absorption présentent une bande à 260 nm caractéristique de l'oligonucléotide et deux bandes à 280 nm et à 450nm caractéristiques de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du ligand bipyridine et de la MLCT (*Metal Ligand Charge Transfer*) du complexe de ruthénium (Figure 16). Avec ces données, si l'on compare le spectre de la molécule **2m** à celui de la molécule **2b**, il est clairement visible que l'ODN est bien plus présent dans le cas de **2b**. Son absorption écrase celle du complexe de ruthénium qui est bien plus visible dans le cas de **2m**.

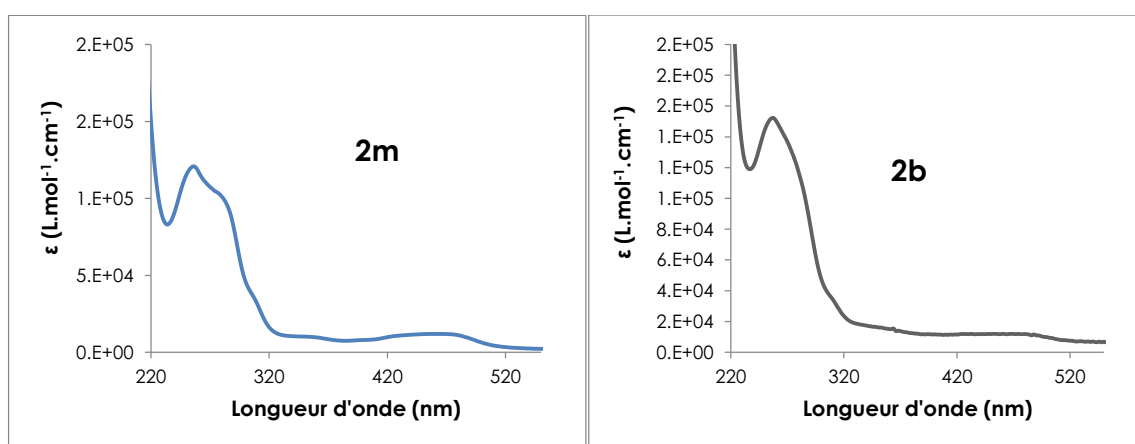


Figure 16 – Spectres UV-Visible des composés 2m (gauche) et 2b (droite).

La spectroscopie de luminescence montre pour une longueur d'onde d'excitation à $\lambda = 458\text{nm}$, une émission centrée sur $\lambda = 652\text{ nm}$ du complexe de ruthénium 2 caractéristique de la transition MLCT du complexe. Cette émission est décalée vers le rouge par rapport au complexe $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ qui a son maximum d'émission à 620 nm . Les spectres d'émission des complexes liés à un et à deux ODNs sont encore décalés vers le rouge (669 et 677 nm respectivement, Figure 17). La formation du lien amide décale donc le maximum d'émission des molécules mono et bis-substituées vers le rouge.

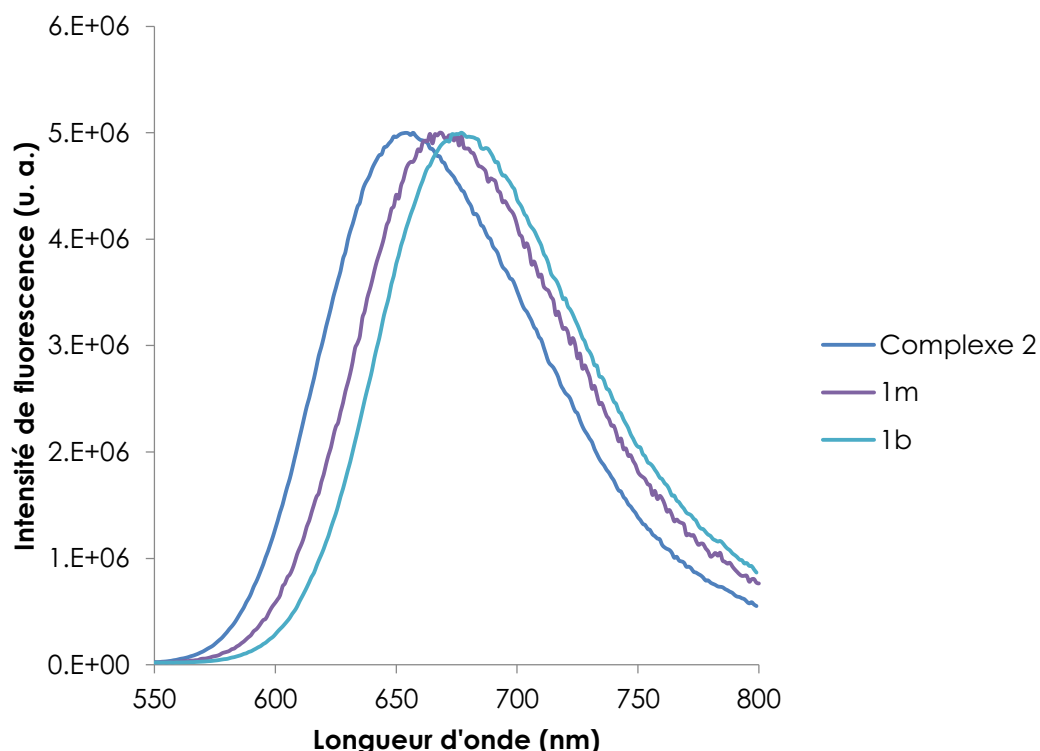


Figure 17 – Exemples de spectres de fluorescence des composés 1m et 1b.

La spectrométrie de masse *electrospray* haute résolution nous a par ailleurs permis de confirmer les structures obtenues. En effet, les spectres d'ESI-MS des molécules **1m**, **2m**, **3m**, **4m**, **5m**, **1b**, **2b**, **3b**, **4b** ont été visualisés. Cette technique n'a pas permis de caractériser les autres molécules. Cependant la cohérence de leur migration sur les gels de PAGE ne laisse pas de doute quant à l'obtention des structures.

Ainsi, cette stratégie de synthèse nous a permis d'obtenir une bibliothèque de produits constitués d'un complexe de ruthénium lié à une ou deux séquences nucléiques dont la longueur et la séquence varient de 14 à 58 nucléotides.

4.2. Synthèses par une réaction CuAAC (Copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition)

4.2.1. La réaction de click chemistry

La réaction de Huisgen a lieu entre une fonction dipolaire – un azoture – et un dipolarophile – un alcyne – pour former un noyau cyclique, un triazole. Cette réaction n'est cependant pas spécifique. L'emploi du cuivre(I) comme catalyseur a permis d'obtenir spécifiquement une cycloaddition 1,3-dipolaire (Figure 18).

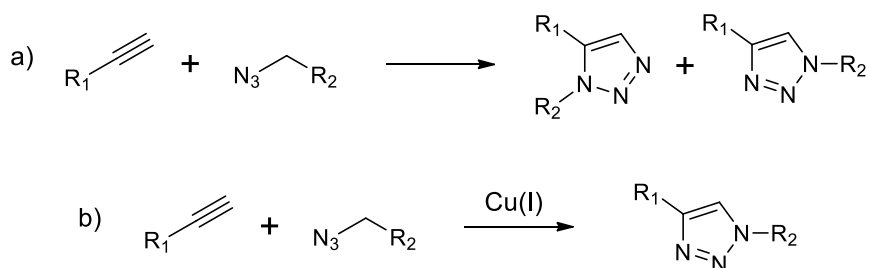


Figure 18 – Réactions de cycloaddition dipolaire de Huisgen (a) et de CuAAC (b).

Parmi les réactions possibles pouvant satisfaire les exigences du concept de *click chemistry*, la CuAAC présente plusieurs avantages, notamment celui de mettre en jeu deux fonctions chimiques relativement inertes, permettant ainsi de travailler dans des conditions variées. Cet aspect fait de cette réaction une candidate idéale pour de nombreuses applications.

A ce jour, deux mécanismes possibles sont proposés pour expliquer la catalyse de cette réaction par un complexe de cuivre I (Figure 19).¹⁵ Dans les deux cas, le premier azote de l'azoture se lie avec un atome de cuivre. La différence entre les deux mécanismes proposés réside dans le nombre d'atomes de Cu⁺ impliqués dans le rapprochement des deux fonctions réactives. Si un seul est impliqué, il se lie à la fonction alcyne puis à l'azote le plus proche du substituant et permet la cycloaddition. Si deux Cu⁺ sont impliqués, le mécanisme est sensiblement similaire ; à ceci près que la structure cuivreuse mis en jeu possède deux atomes de Cu⁺ et que chacun joue un rôle : l'un se lie à la fonction alcyne et l'autre à l'azote de l'azoture le plus proche du substituant. Dans les deux cas, une cycloaddition 1,3 est favorisée pour la formation du noyau triazole.

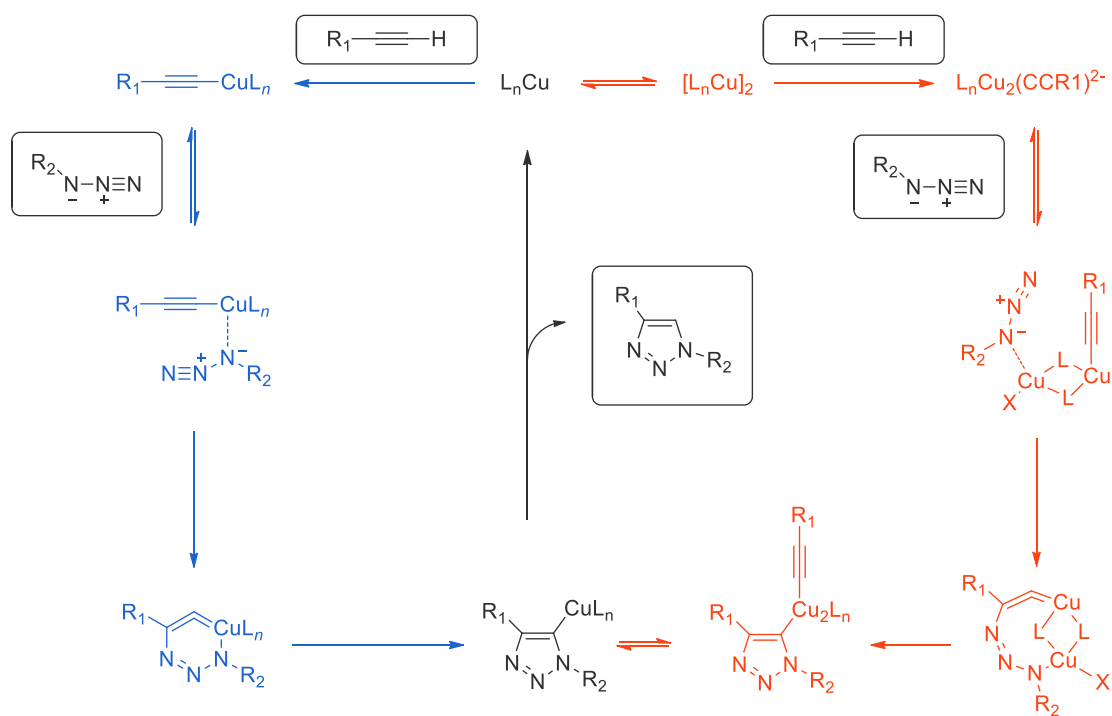


Figure 19 – Cycles catalytiques proposés pour la CuAAC. Gris anthracite : parties communes aux deux mécanismes ; bleu & orange : deux mécanismes distincts.

4.2.2. Synthèse

Dans les paragraphes 2 et 3, nous avons décrit les synthèses des complexes de ruthénium et des oligonucléotides fonctionnalisés par des fonctions alcyne et azoture. Dans ce manuscrit, seuls les couplages par une réaction de click chemistry des complexes métalliques mono et bis azoture avec les oligonucléotides modifiés par un groupe aminohexyle en position 5'- seront présentés. En effet, la réaction entre les complexes de ruthénium dérivés alcyne et l'ODN possédant une fonction azoture en position 5'- n'a donné lieu qu'à des tests préliminaires et elle est toujours en cours de développement.

4.2.2.1. Conditions opératoires

Comme vu en introduction de ce paragraphe, la réaction de CuAAC est catalysée au cuivre sous sa forme d'oxydation I. Les conditions les plus communément rencontrées dans la littérature utilisent le sel de cuivre $CuSO_4$ avec du Na-L-ascorbate qui permet de réduire le Cu(II) en Cu(I).¹⁶⁻¹⁸ D'autres conditions utilisent le $[Cu(CH_3CN)_4](PF_6)$, déjà à l'état d'oxydation (I), avec de la 2,6-lutidine (2,6-diméthylpyridine).¹⁹ Après avoir testé ces deux couples réactionnels, il s'est avéré

que les résultats étaient sensiblement les mêmes. Pour la poursuite du projet, les réactifs $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4](\text{PF}_6)$ et 2,6-lutidine ont été privilégiés.

L'utilisation de cuivre en présence d'ADN pose cependant un problème. Des dégradations peuvent être causées par le Cu^+ qui en présence d'eau peut former des radicaux $\cdot\text{OH}$. Le Cu^{2+} peut par ailleurs oxyder l'oligonucléotide.²⁰ Pour pallier ces problèmes, des ligands stabilisant le $\text{Cu}(\text{I})$ ont permis de limiter la formation de ces radicaux. Le plus connu est le tris(benzyltriazolyméthyl)amine (TBTA)²¹⁻²³ (Figure 20), mais ce dernier présente une faible solubilité dans l'eau. Une alternative à ce ligand est le ligand tris(3-hydroxypropyl-triazolyméthyl)amine (THPTA)²⁴⁻²⁶ (Figure 20) qui est beaucoup plus soluble dans l'eau et qui, par ailleurs, améliore le rendement de la réaction.²⁷ C'est donc ce dernier ligand THPTA qui a été utilisé dans ce travail.

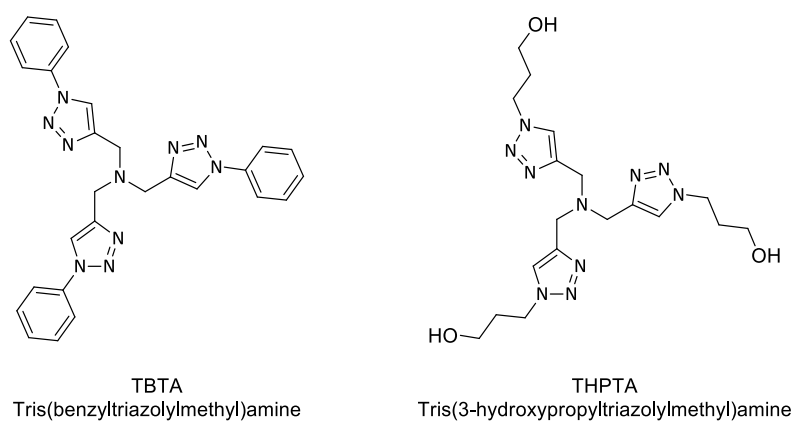


Figure 20 – Structures chimiques des ligands du cuivre TBTA et THPTA.

Les conditions opératoires générales utilisées sont les suivantes. Les synthèses ont été effectuées sous atmosphère d'Argon à 25°C pendant deux heures, avec 100 équivalents de $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4](\text{PF}_6)$, 200 équivalents de 2,6-Lutidine et 6 équivalents de ligand THPTA dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/t\text{BuOH}/\text{DMSO}$ (de l'ordre de 18/13/8/2) à une concentration finale de l'ordre de 10^{-4} mol.L⁻¹. Bien qu'une concentration en THPTA égale à celle du cuivre semble nécessaire, l'expérience a montré que 6 équivalents en THPTA par rapport au cuivre étaient suffisants.

4.2.2.2. Synthèses

La réaction de CuAAC a permis d'atteindre trois types de complexes de ruthénium fonctionnalisés par des acides nucléiques : des complexes métalliques avec un seul oligonucléotide, avec deux ODNs identiques, et enfin avec deux ODNs différents.

Ces nouveaux complexes hybrides seront nommés de la façon suivante dans la suite du manuscrit : **Ru** suivit du numéro du complexe puis de **m** ou **b** pour une mono ou bis-fonctionnalisation et enfin du ou des numéros de la ou des séquences d'acides nucléiques introduite(s) sur le composé métallique.

4.2.2.2.1. Molécules hybrides Ruthénium/ODN monosubstituées

Le premier objet synthétisé a été réalisé à partir du complexe de ruthénium **19** qui ne possède qu'une fonction azoture. La réaction a été faite en présence de quatre équivalents de ce complexe pour un équivalent d'ODN alcyne **10**. Cette synthèse a permis d'obtenir spécifiquement et avec un rendement quantitatif la molécule cible : le complexe de ruthénium **Ru19m10** possédant un seul ODN **10** de 14 nucléotides (Figure 21).

Cette synthèse a été reproduite avec la séquence **5a** pour donner la molécule cible **Ru19m5a** comportant un simple brin de 24 nucléotides (Figure 22). La formation de ces deux nouvelles molécules a été montrée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Figure 27).

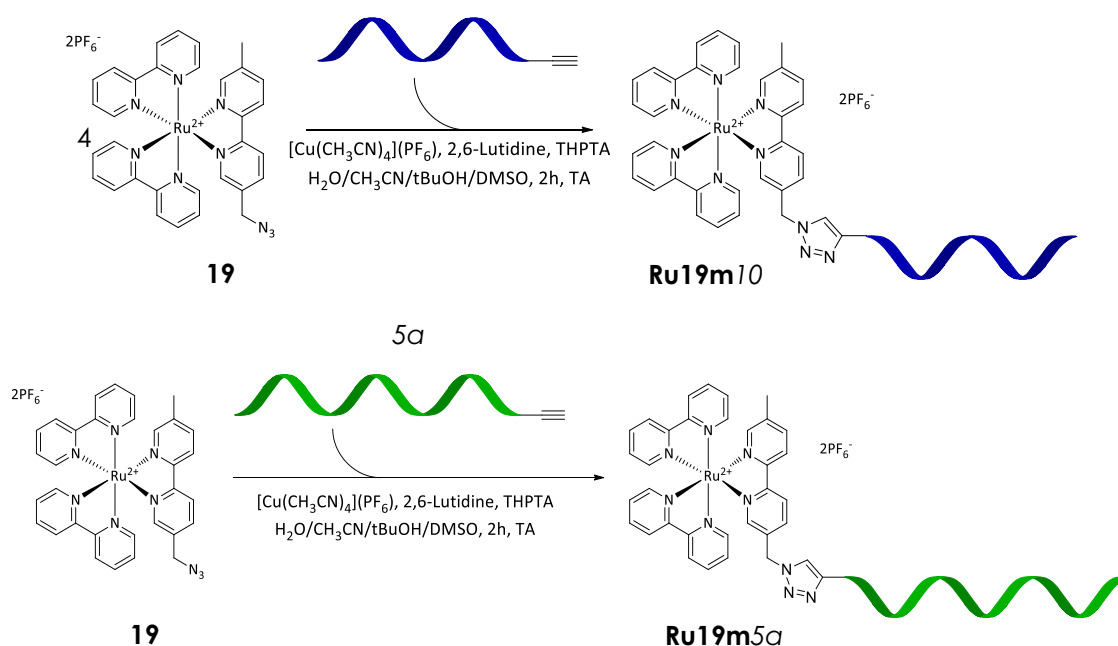


Figure 21 – Synthèses des complexes de ruthénium mono-substitués **Ru19m10** et **Ru19m5a**.

4.2.2.2.2. Molécules hybrides Ruthénium/ODN bis-substituées symétriques

La synthèse des complexes de ruthénium fonctionnalisés par deux oligonucléotides identiques a été effectuée en utilisant le complexe de ruthénium **26** et un

excès de 3 équivalents des séquences *10* ou *6a*. Le résultat est l'obtention quantitative de complexes de ruthénium liés à deux ODNs *10* ou *6a*, les complexes **Ru26b10** et **Ru26b6a** (Figure 22). Ces deux composés se différencient par la longueur des séquences d'acides nucléiques introduites qui sont de 14 et 24 nucléotides pour respectivement **Ru26b10** et **Ru26b6a**.

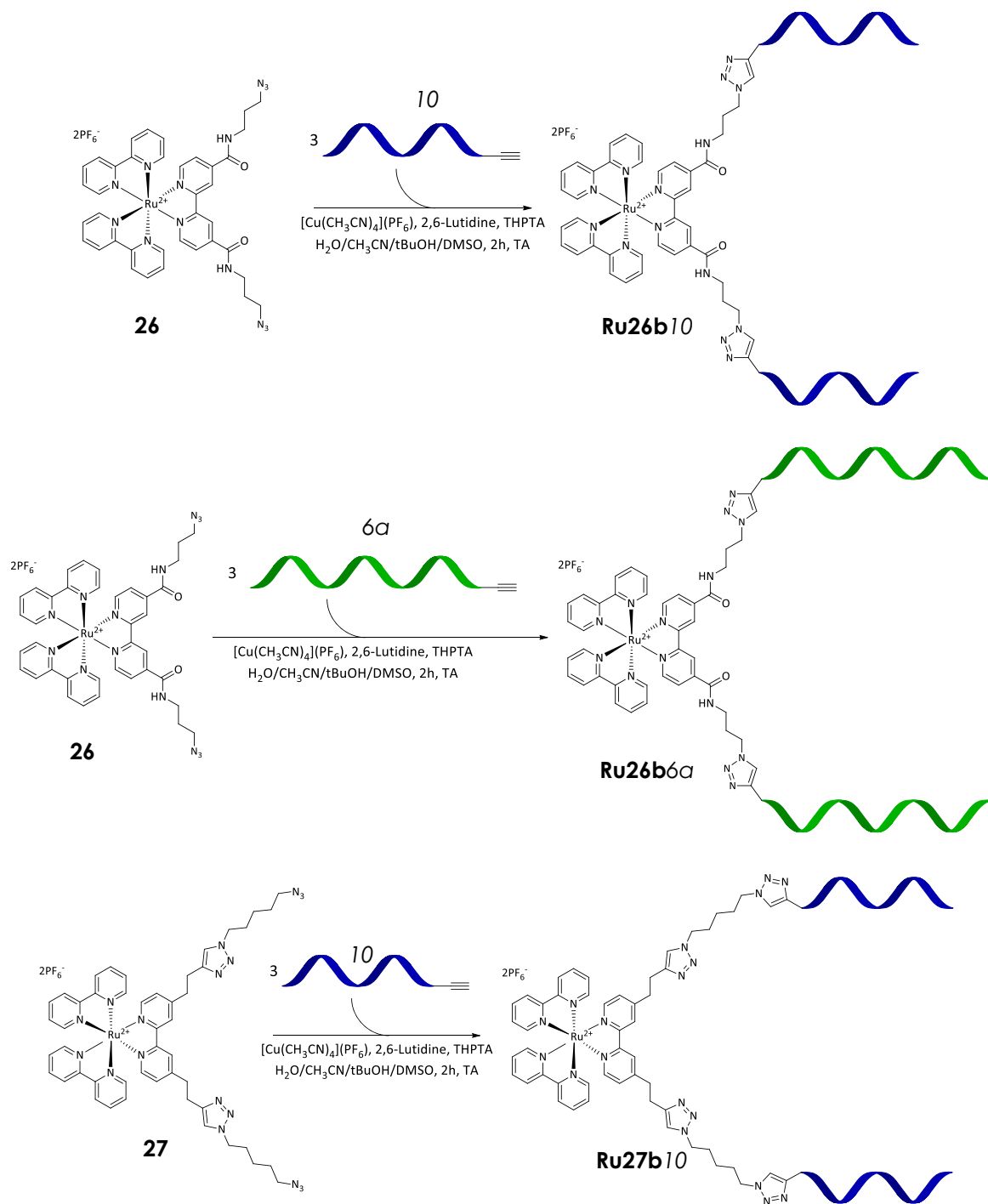


Figure 22 – Synthèses des molécules hybrides ruthénium/ODN **Ru26b10**, **Ru26b6a** et **Ru27b10**.

Une autre voie de synthèse permet d'atteindre des complexes de ruthénium di-fonctionnalisés par des ODNs. Pour cela, le complexe **27** est utilisé en lieu et place du complexe précédent **26**. En présence d'un excès de l'oligonucléotide **10** et dans les mêmes conditions opératoires de click chemistry que précédemment, le complexe **Ru27 b 10** est synthétisé (Figure 22).

Ce protocole expérimental a aussi été appliqué au ligand 2,2'-bipyridine fonctionnalisé par deux méthylazoture en position 4 et 4' **28**. Cette molécule est issue d'une réaction de substitution des chlores du ligand **18** par deux azotures en présence de NaN_3 dans le DMF à 60°C . Ensuite, une réaction de CuAAC a été réalisée avec la 2,2'-bipyridine bis-fonctionnée par deux azotures **28** et un excès de l'ODN **9** (3 équivalents). Cette synthèse a permis de former le ligand **Bipyridine28b9** composé d'une 2,2'-bipyridine substituée par deux séquences identiques **9** (Figure 23).

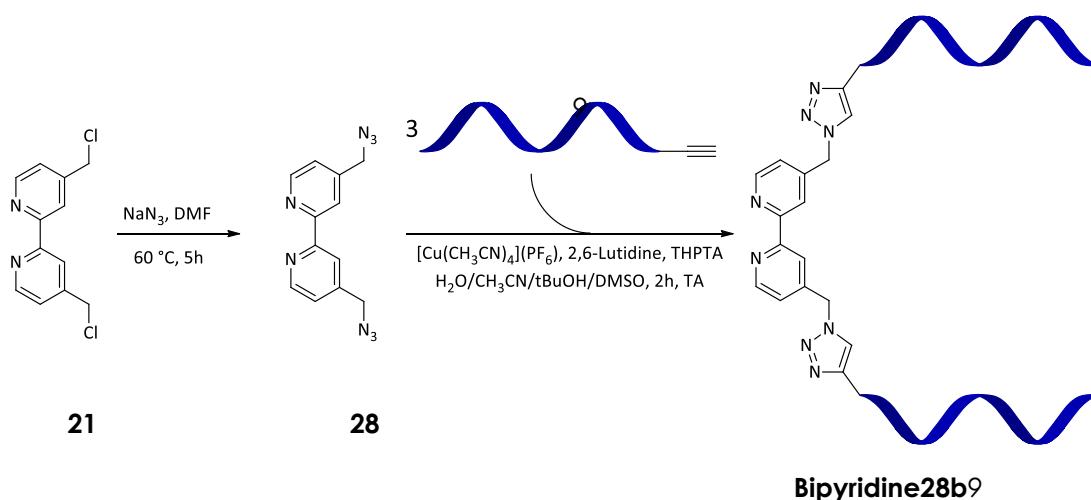


Figure 23 – Synthèse du produit hybride Bipyridine28b9.

4.2.2.2.3. Molécules hybrides Ruthénium/ODN di-substituées dissymétriques

Le troisième type de briques d'assemblage Complexe de ruthénium-Oligonucléotides est un complexe métallique fonctionnalisé par deux acides nucléiques différents. La synthèse est réalisée en deux étapes successives à partir du complexe **26**. La première étape consiste à faire réagir en excès le complexe de ruthénium (50 équivalents) avec un équivalent d'ODN **10** dans les conditions de réaction de CuAAC. Le but de cette première réaction de click chemistry est d'obtenir une mono-fonctionnalisation et de conserver la deuxième fonction azoture libre. La molécule **Ru26m10** mono-substituée par une séquence ODN de 14 bases est ainsi obtenue (Figure 24).

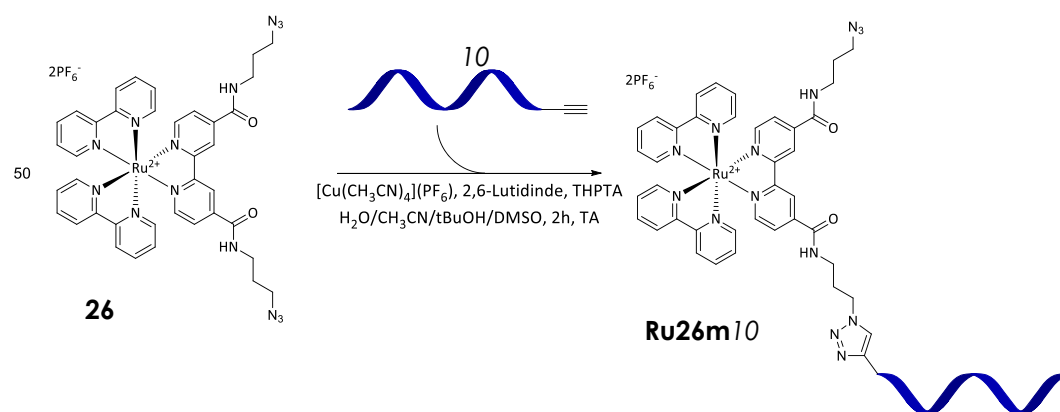


Figure 24 – Synthèse de la molécule **Ru26m10**.

Le brut de réaction est purifié par dialyse sur un microfiltre dialyseur avec un *cut-off* de 3000 g.mol^{-1} afin d'éliminer l'excès de complexes de ruthénium. Le dialysat est ensuite soumis à une deuxième CuAAC dans les mêmes conditions que la première avec l'ODN alcyne **6a** en excès. Le produit résultant de cette synthèse correspond au complexe de ruthénium **Ru26b10-6a** portant deux ODN différents de séquences **10** et **6a** (Figure 25).

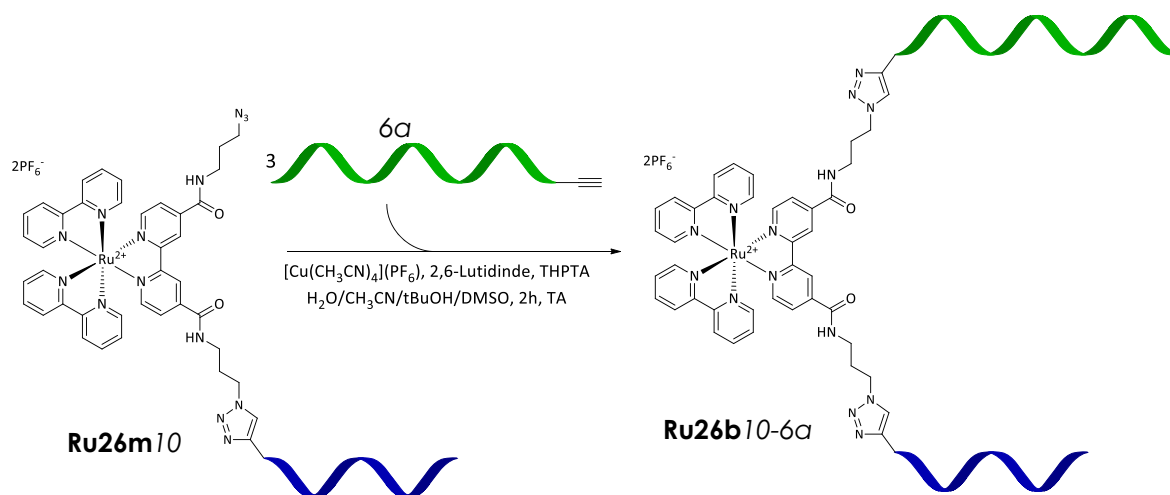


Figure 25 – Synthèse du complexe de ruthénium **Ru26b10-6a**.

4.2.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'ensemble des molécules synthétisées a été caractérisé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 20% en conditions dénaturantes.

Le gel d'électrophorèse de la Figure 26 montre la migration des molécules cibles obtenues au travers des diverses synthèses précédentes.

Les lignes 1, 2, 3 et 4 montrent la migration des ODNs 9, 10, 5a et 6a respectivement.

Les lignes 5 et 6 présentent les produits de couplage obtenus à partir du complexe de ruthénium fonctionnalisé par une seule fonction azoture **16** et les acides nucléiques 10 et 5a. Dans les deux cas, une seule bande est visible sur le gel d'électrophorèse et elle migre moins vite que celles des ODNs correspondants. Cela nous indique qu'un seul produit de synthèse est obtenu, les complexes **Ru19m10** et **Ru19m5a** et que la réaction est quantitative. En effet, aucune bande correspondant à l'oligonucléotide n'ayant pas réagi n'est présente. Cette synthèse conduit donc à la formation spécifique et quantitative de complexes de ruthénium fonctionnalisé par un seul simple brin d'ODN.

La formation des complexes de ruthénium di-fonctionnalisés par des acides nucléiques identiques est prouvé aux lignes 8 et 10. Pour chacune, deux bandes sont visibles. Par comparaison avec les lignes 2 et 4, les bandes migrant les plus vites sont attribuables aux ODNs mis en excès. Les bandes les moins mobiles correspondent à la synthèse, respectivement, des entités symétriques **Ru26b10** et **Ru26b6a**.

La ligne 7 présente le résultat de la première étape de la synthèse d'un complexe de ruthénium avec deux oligonucléotides différents. En effet, nous avons voulu vérifier que la première réaction de CuAAC réalisée avec un très large excès de complexe métallique **26** conduisait bien majoritairement à la formation du produit mono-fonctionnalisé. La bande majoritaire correspond bien au produit attendu **Ru26m10**.

La ligne 9 présente la migration des molécules issues de la double réaction de click chemistry du complexe de ruthénium **26** avec deux séquences ODNs différentes de 14 et 24 bases, 10 et 6a. Là encore, l'ODN 6a introduit en excès lors de la deuxième étape est visible par comparaison avec la ligne 4. De même, par comparaison avec la ligne 10, nous pouvons attribuer la bande migrant le moins au complexe de ruthénium symétrique **Ru26b6a**. Ce produit est formé lors de la deuxième étape de synthèse. En effet, lors de la dialyse de la solution obtenue lors de la première étape, le complexe de ruthénium **26** qui a été introduit en large excès (50 eq.) n'est pas totalement éliminé. De ce fait, lors de la deuxième CuAAC sur le dialysat, le complexe métallique **26** restant réagit avec l'excès d'ODN 6a et

forme le produit **Ru23b6a**. La bande du milieu correspond au composé cible, le complexe de ruthénium di-fonctionnalisé dissymétrique **Ru26b10-6a**. Par référence à la ligne 7, l'absence d'une bande correspondant à la molécule **Ru26m10** obtenue à la première étape de synthèse montre à nouveau que la réaction de *click chemistry* utilisée est quantitative.

Enfin, la ligne 11 de ce gel correspond à la formation de la 2,2'-bipyridine di-fonctionnalisée symétrique **Bipyridine28b9**. L'ODN en excès est ici aussi visible.

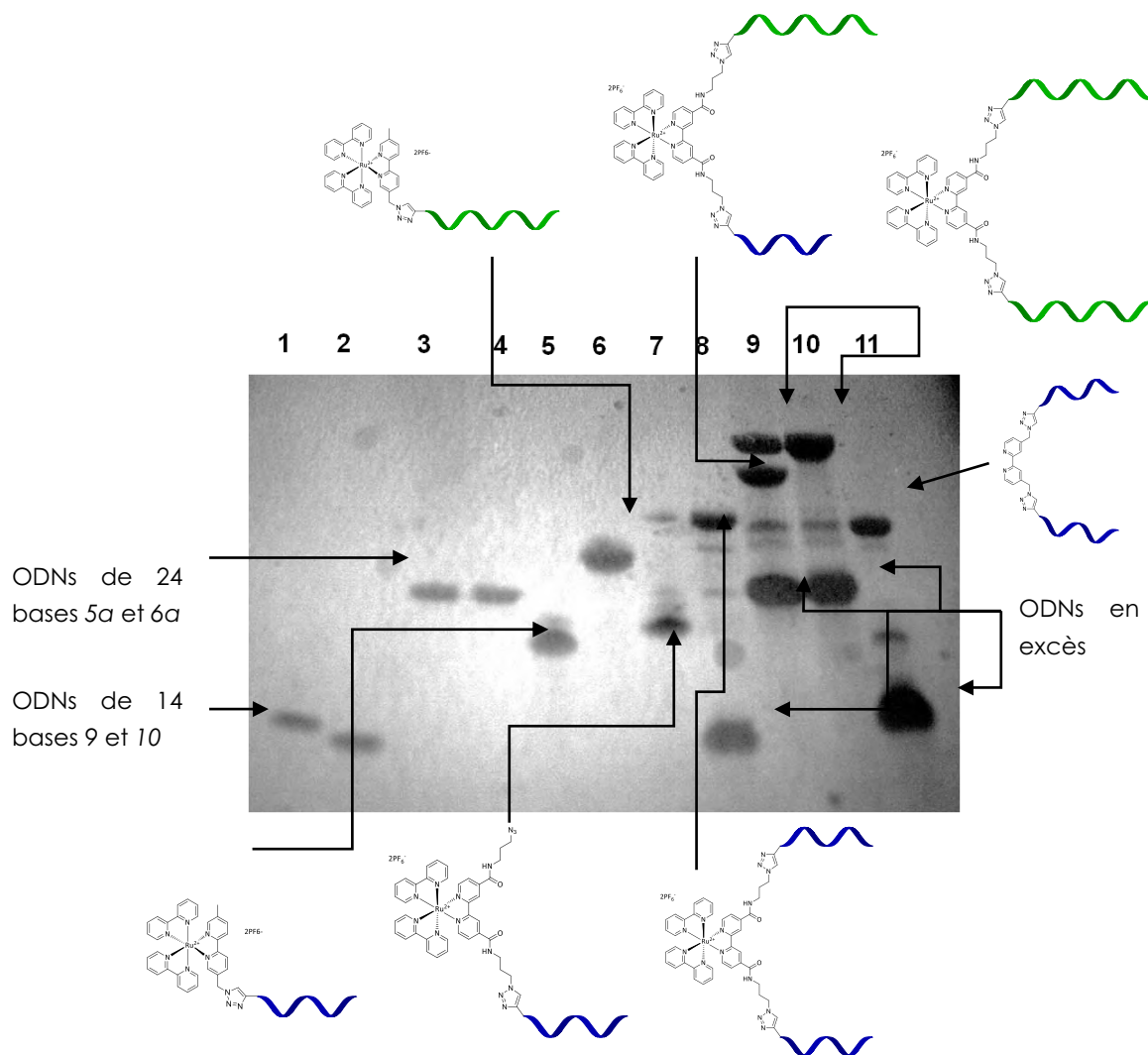


Figure 26 – Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 20% en conditions dénaturantes des réactions de couplage par CuAAC visualisée à $\lambda = 254 \text{ nm}$: Ligne 1 : 9 ; ligne 2 : 10 ; ligne 3 : 5a ; ligne 4 : 6a ; ligne 5 : synthèse de **Ru19m10** ; ligne 6 : synthèse de **Ru19m5a** ; ligne 7 : synthèse de **Ru26m10** ; ligne 8 : synthèse de **Ru26b10** ; ligne 9 : synthèse de **Ru26b10-6a** ; ligne 10 : synthèse de **Ru26b6a** ; ligne 11 : synthèse de **Bipyridine25b9**.

La CuAAC a permis de mettre en place une synthèse efficace pour la formation des molécules hybrides cibles. Les complexes de ruthénium fonctionnalisés par des fonctions azoture ainsi que les ODNs fonctionnalisés par des alcynes ont été à la base de la synthèse de ces molécules. La CuAAC a permis de lier ces entités et de former les objets **Ru19m5a**, **Ru19m10**, **Ru26b6a** et **Ru26b10**. Cependant, l'avantage de cette synthèse est ce qui la différencie de la synthèse peptidique : la formation d'une molécule hybride avec deux ODNs différents **Ru26b10-6a**.

5. Conclusions sur la synthèse d'hybrides ruthénium/ADN

Les molécules cibles servant de base aux assemblages hybrides ruthénium/ADN ont été obtenues par deux stratégies de synthèses.

La première voie de synthèse utilise le couplage peptidique. À partir d'un complexe de ruthénium fonctionnalisé par deux acides carboxyliques et de séquences d'acides nucléiques fonctionnalisées par une amine primaire en position 5', la réaction d'amidation a permis d'obtenir en une seule étape deux objets : des complexes de ruthénium liés à un ou deux ODNs identiques. Ainsi, l'utilisation de nombreux ODNs dont les séquences vont de 14 à 58 bases (1 à 8, Table 1) a permis d'obtenir une nouvelle bibliothèque de structures Complexe de ruthénium-oligonucléotide nécessaire à la construction des assemblages envisagés.

La deuxième stratégie de synthèse – la synthèse par CuAAC – a permis d'obtenir des molécules similaires. En effet, le couplage par CuAAC des complexes de ruthénium fonctionnalisés par des azotures et des ODNs possédant une fonction terminale alcyne en position 5' permet d'atteindre, non seulement, les complexes métalliques hybrides composés d'un ou de deux ODNs identiques, mais également un complexe de ruthénium lié à deux ODNs différents. La réaction de CuAAC nous a permis de former une nouvelle structure non obtenue par couplage peptidique. De plus, cette synthèse est plus modulaire, plus efficace et plus rapide que le couplage par réaction d'amidation.

Chapitre 2

- (1) He, Y.; Liu, D. R. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133, 9972.
- (2) Kleiner, R. E.; Dumelin, C. E.; Liu, D. R. *Chemical Society Reviews* **2011**, 40, 5707.
- (3) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40, 2004.
- (4) Terpetschnig, E.; Szmecinski, H.; Malak, H.; Lakowicz, J. R. *Biophysical Journal* **1995**, 68, 342.
- (5) Haberecht, M. C. B., Michael; Bats, Jan W.; Lerner, Hans-Wolfram; Wagner, Matthias *Zeitschrift fuer Naturforschung, B: Chemical Sciences* **2005**, 60, 745.
- (6) Schubert, U. S.; Eschbaumer, C.; Hochwimmer, G. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 8643.
- (7) Savage, S. A.; Smith, A. P.; Fraser, C. L. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, 10048.
- (8) Göritz, M.; Krämer, R. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 18016.
- (9) Graf, N.; Göritz, M.; Krämer, R. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45, 4013.
- (10) Banuls, V.; Escudier, J.-M.; Zedde, C.; Claparols, C.; Donnadiou, B.; Plaisancié, H. *European Journal of Organic Chemistry* **2001**, 2001, 4693.
- (11) Lietard, J.; Meyer, A.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F. *Tetrahedron Letters* **2007**, 48, 8795.
- (12) James, D.; Escudier, J.-M.; Amigues, E.; Schulz, J.; Vitry, C.; Bordenave, T.; Szlosek-Pinaud, M.; Fouquet, E. *Tetrahedron Letters* **2010**, 51, 1230.
- (13) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827.
- (14) Heemstra, J. M.; Liu, D. R. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, 11347.
- (15) Spiteri, C.; Moses, J. E. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49, 31.
- (16) Thomson, D. A. C.; Tee, E. H. L.; Tran, N. T. D.; Monteiro, M. J.; Cooper, M. A. *Biomacromolecules* **2012**, 13, 1981.
- (17) Beckmann, H. S.; Moller, H. M.; Wittmann, V. *Beilstein J Org Chem* **2012**, 8, 819.
- (18) Seela, F.; Pujari, S. S. *Bioconjugate Chemistry* **2010**, 21, 1629.
- (19) Kluger, C.; Binder, W. H. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2007**, 45, 485.
- (20) Burrows, C. J.; Muller, J. G. *Chemical Reviews* **1998**, 98, 1109.
- (21) Seela, F.; Xiong, H.; Budow, S. *Tetrahedron* **2010**, 66, 3930.
- (22) Andersen, N. K.; Spřilovř, L.; Jensen, M. D.; Kořalka, P.; Jensen, F.; Nielsen, P. *Nucleic Acids Symposium Series* **2008**, 52, 149.

- (23) Fujino, T.; Yamazaki, N.; Hasome, A.; Endo, K.; Isobe, H. *Tetrahedron Letters* **2012**, 53, 868.
- (24) Bonnet, R.; Murat, P.; Spinelli, N.; Defrancq, E. *Chemical Communications* **2012**, 48, 5992.
- (25) Shen, Q.; Tang, S.; Li, W.; Nie, Z.; Liu, Z.; Huang, Y.; Yao, S. *Chemical Communications* **2012**, 48, 281.
- (26) Peng, X.; Li, H.; Seidman, M. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, 2010, 4194.
- (27) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Organic Letters* **2004**, 6, 2853.

Chapitre 3

Construction d'assemblages Complexe de ruthénium/ODN linéaires et en étoile

Chapitre 3

Construction d'assemblages Ru-ODN linéaires et en étoile

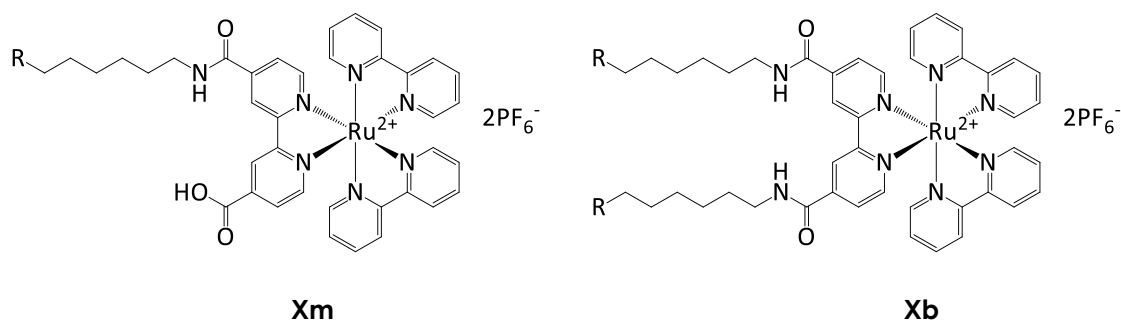
Les structures moléculaires décrites précédemment sont la base du travail de ce manuscrit. Les oligonucléotides les composant nous ont permis – de par leur propriété d'hybridation – de lier entre eux, et ce de manière contrôlée, des complexes de ruthénium sur une, deux ou encore trois dimensions. Dans ce chapitre, deux types d'assemblages vont être décrits : des assemblages linéaires composés de un à sept complexes de ruthénium et des assemblages en forme d'étoile à trois branches dont les complexes de ruthénium ont été insérés à la périphérie de la structure et/ou en son cœur.

1. Assemblages linéaires

1.1. Synthèses des assemblages linéaires

1.1.1. Séquences des briques d'assemblage Ru-ODN utilisées

Dans le chapitre 2, nous avons décrit la synthèse par formation d'un lien amide d'une nouvelle famille de complexes de ruthénium hybrides fonctionnalisés par une ou deux séquences ODNs. C'est l'ensemble de ces briques moléculaires qui a été employé dans cette première partie du projet. Les séquences comportant 14, 20, 24, 34 et 58 bases nucléiques utilisées sont rappelées dans la Table 1.



X	Nombre de bases	R
1	14	5'-AGG TCT TCA GTA CG-3'
2	14	5'-CGT ACT GAA GAC CT-3'
3	20	5'-GAG ACT CGA CGC TGC ATG AG-3'
4	20	5'-CTC ATG CAG CGT CGA GTC TC-3'
5	24	5'-GTA GCA AGC CTG CCT CTG AGT CCG-3'
6	24	5'-CGG ACT CAG AGG CAG GCT TGC TAC-3'
7	34	5'-CGT ACT GAA GAC CT CTC ATG CAG CGT CGA GTC TC-3'
8	58	5'-CGT ACT GAA GAC CT CTC ATG CAG CGT CGA GTC TC GTA GCA AGC CTG CCT CTG AGT CCG-3'

Table 1 – Séquences nucléiques utilisées pour la formation des assemblages linéaires.

1.1.2. Conditions d'hybridation

L'ensemble des hybridations des différentes séquences nucléiques utilisées a été réalisé dans les mêmes conditions opératoires. Celles-ci ont consisté à mélanger le nombre approprié d'équivalents de chaque ODNs seuls ou liés à un complexe de ruthénium dans un milieu tamponné à pH = 7,2 composé de $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ Tris, $100 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl et $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ MgCl_2 pour une concentration finale de $50 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Les solutions ont été chauffées à 90°C pendant trois minutes puis laissées revenir lentement à la température ambiante. Ensuite, les mélanges ont été mis à quatre degrés pendant 12 heures.

1.1.3. Assemblages formés à l'aide des complexes Ruthénium mono-ODN

Les complexes de ruthénium hybrides fonctionnalisés par un seul brin d'ODN **1m**, **2m**, **3m**, **4m**, **5m** et **6m** ont conduit à la formation de deux types de doubles brins d'ODN : des duplexes avec un seul complexe de Ru quand ils sont hybridés avec leur complémentaire ADN (B) et des duplexes avec deux complexes métalliques par hybridation avec leur complémentaire fonctionnalisé par un complexe de ruthénium (C) (Figure 1).

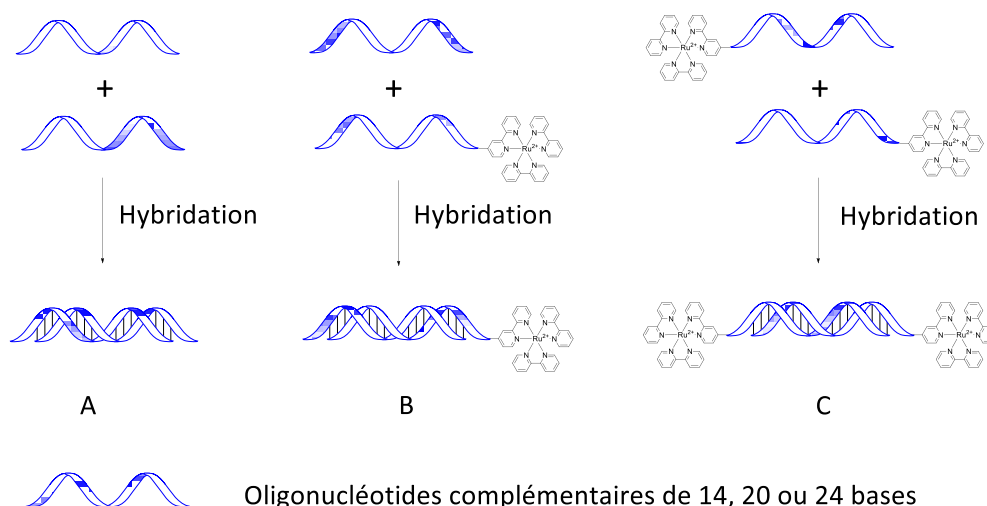


Figure 1 – Construction de double-hélices avec aucun (A), un (B) ou deux (C) complexes de ruthénium.

Dans ces premiers exemples d'hybridation des objets hybrides Ru-ODN, la distance entre deux complexes de ruthénium peut être de 14, 20 ou 24 bases nucléiques suivant les séquences utilisées et les complexes se trouvent en bout de structures.

1.1.4. Assemblages formés à l'aide des complexes Ruthénium bis-ODNs

L'utilisation des complexes de ruthénium bis-ODNs permet de réaliser des assemblages comportant cette fois-ci un complexe de ruthénium central et d'obtenir les premiers objets à plus de deux complexes de ruthénium.

L'hybridation des séquences de **2b**, **4b** et **6b** avec leurs complémentaires ADN **1**, **3**, et **5** respectivement conduit à la formation des structures avec un complexe métallique central (14D, 20D et 24D) (Figure 2). Dans les mêmes conditions d'hybridation, mais en utilisant les séquences complémentaires portant un complexes de Ru **1m**, **3m**, et **5m**, on obtient des assemblages linéaires avec trois complexes de

ruthénium (E) (Figure 2). Ces structures comportent un complexe métallique central et deux complexes en périphérie.

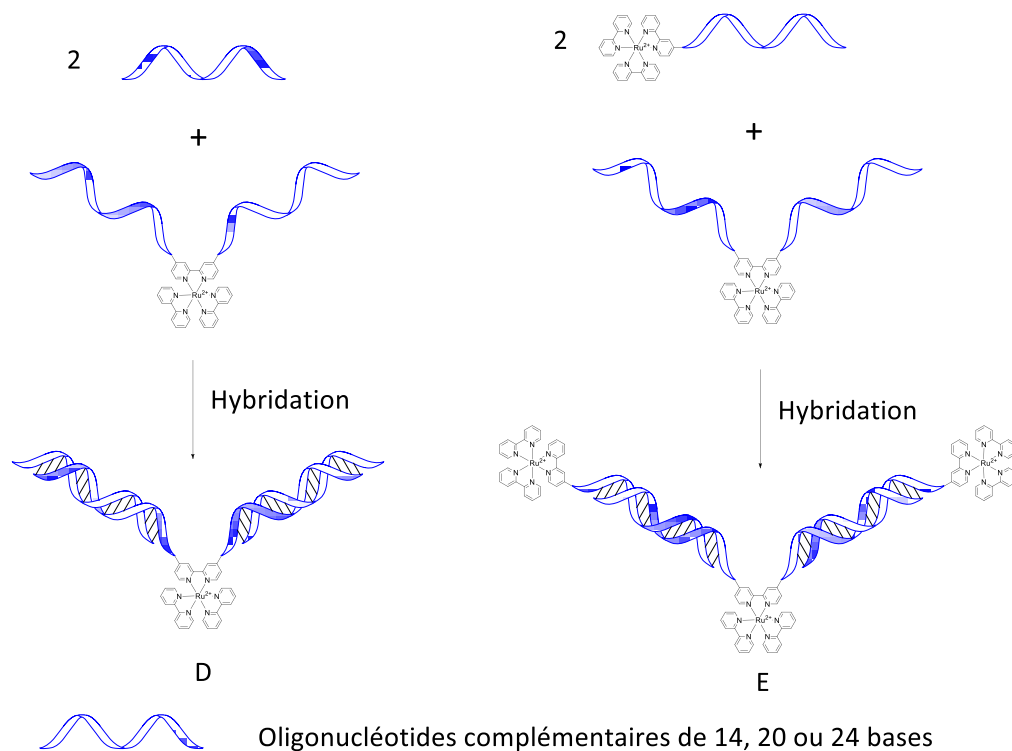


Figure 2 - Construction d'assemblages linéaires avec un complexe de ruthénium central (D) ou trois complexes de ruthénium (E) avec 3 longueurs d'oligonucléotides différentes (14, 20 et 24 bases).

Afin d'augmenter la distance entre deux complexes de ruthénium et de construire des structures linéaires possédant un nombre de ruthénium supérieur à trois, deux nouvelles briques moléculaires hybrides **7b** et **8b** ont été synthétisées. La séquence de leurs ODNs comporte respectivement 34 et 58 bases. Ces séquences ont été choisies de telle sorte à être l'enchaînement des séquences **2**, **4** et **6**. Ainsi, les oligonucléotides de 34 bases de **7b** est l'addition des séquences 14 et 20 mer de **2** et **4**. De même, les ODNs de 58 bases de **8b** sont quant à eux, l'enchaînement des séquences de 14, 20 et 24 bases de **2**, **4** et **6**.

Les premières structures obtenues comportent seulement un complexe de ruthénium central. Elles sont réalisées en hybridant les séquences **7b** avec deux équivalents des oligonucléotides complémentaires **1** et **3** (34F) et **8b** avec deux équivalents de **1**, **3** et **5** (58F) (Figure 3). Ces molécules présentent donc deux doubles brins centrés sur un complexe de ruthénium.

Si les ODNs complémentaires terminaux **3** et **5** sont remplacés par les complémentaires portant un complexe de ruthénium **3m** et **5m**, les assemblages linéaires à trois complexes métalliques 34G et 58G sont obtenus (Figure 3).

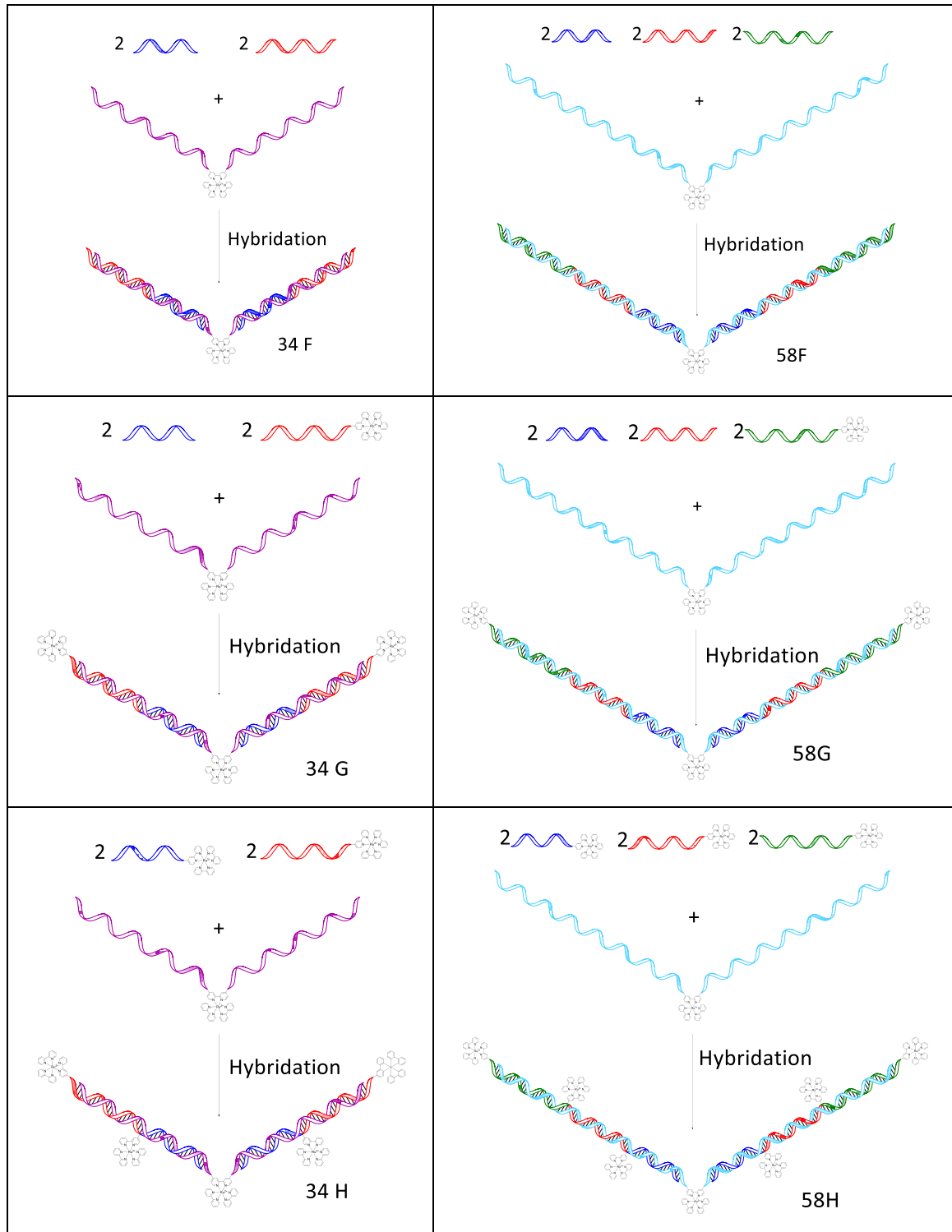


Figure 3 – Assemblages linéaires à partir des complexes de ruthénium 7b et 8b.

La construction des assemblages linéaires possédant plus de trois complexes métalliques est obtenue en substituant tous les brins d'ADN complémentaires par leur équivalent mono-ruthénium. L'hybridation de **7b** avec deux équivalents de **1m** et **3m** conduit à la formation d'un assemblage linéaire composé de 5 complexes de ruthénium 34H. La construction d'une structure linéaire portant sept complexes de ruthénium (58H) a été réalisée par hybridation de **8b** avec deux équivalents de **1m**, **3m** et **5m** (Figure 3). Ces deux nouveaux assemblages comportent un complexe de ruthénium central et un à chaque extrémité des brins courts de 14, 20 et 24 bases.

1.2. Caractérisations des assemblages linéaires

1.2.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'hybridation des séquences a été mise en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) en condition native à 7 °C. La visualisation des bandes des structures formées est obtenue par illumination des gels de polyacrylamide à la longueur d'onde $\lambda = 254$ nm et sur une table d'illumination Safe Imager™ 2.0 Blue-light transilluminator. Sur la table d'illumination, seuls les édifices portant au minimum un complexe de ruthénium sont visibles.

Le gel de polyacrylamide de la Figure 4 met en évidence la formation des doubles brins d'ADN portant 0, un ou deux complexes de ruthénium. Aux lignes 1, 4 et 7, nous pouvons observer les simples duplexes ADN composés respectivement par 14, 20 et 24 paires de bases.

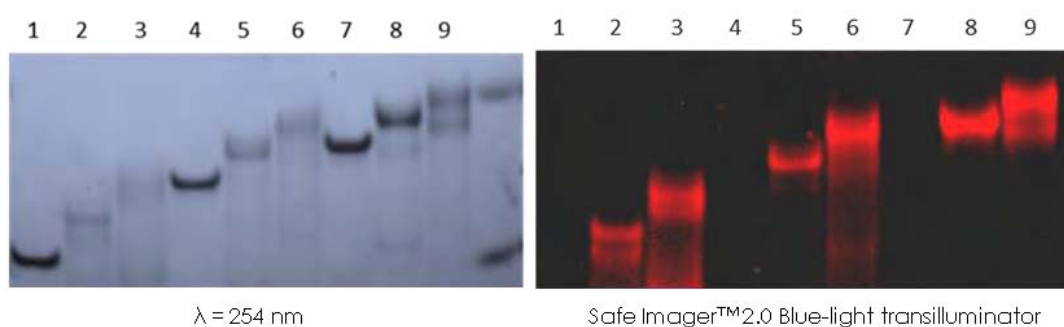


Figure 4 – Gel de polyacrylamide (20 %) en condition native à $\lambda = 254$ nm (gauche) et sur Safe Imager™ 2.0 Blue-light transilluminator (droite) de l'hybridation des ODNs de 14, 20 et 24 bases. Lignes (1) : **1 + 2** ; (2) : **1m + 2** ; (3) : **1m + 2m** ; (4) : **3 + 4** ; (5) : **3m + 4** ; (6) : **3m + 4m** ; (7) : **5 + 6** ; (8) : **5m + 6** ; (9) : **5m + 6m**.

La substitution d'un des brins d'ADN par la molécule hybrides mono-ruthénium/ODN équivalente conduit à la formation des doubles hélices migrant en lignes 2, 5 et 8. La présence d'un complexe de ruthénium ralentit la migration des édifices à cause de l'augmentation de leur taille mais également à cause des deux charges positives du complexe de ruthénium.

Les structures formées d'un duplex d'ODNs et de deux complexes de ruthénium voient leur mobilité électrophorétique diminuer encore de par la présence du deuxième complexe de ruthénium et la présence de deux charges positives supplémentaires (Figure 4, lignes 3, 6 et 9).

L'obtention des assemblages linéaires composés de trois complexes de ruthéniums est illustrée dans la Figure 5. Ce gel d'électrophorèse sur polyacrylamide montre la plupart des structures hybrides obtenues avec des oligonucléotides de 14 bases nucléiques.

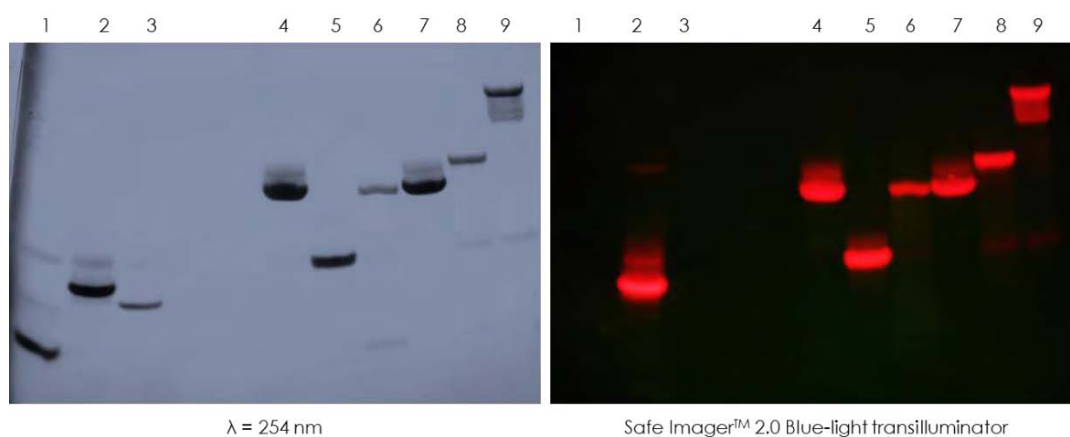


Figure 5 – Gel de polyacrylamide (20%) en condition native à $\lambda = 254\text{nm}$ (gauche) et sur Safe Imager™ 2.0 Blue-light transilluminator (droite). Lignes (1) : **1** ; (2) : **1m** ; (3) : **2** ; (4) : **1b** ; (5) : **2m** ; (6) : **1+2m** ; (7) : **2b** ; (8) : **1m+2m** ; (9) : **1b + 2 eq. 2m**.

La migration des deux simples brins d'ADN de 14 bases **1** et **2** est observée aux lignes 1 et 3, ainsi que celle de leurs pendants avec un complexe de ruthénium **1m** et **2m** aux lignes 2 et 5. Les deux complexes de ruthénium liés à deux ODNs symétriques de 14 bases **1b** et **2b** sont présentés en lignes 4 et 7. Le gel présente également les assemblages correspondant à des duplexes avec un et deux complexes de ruthénium (lignes 6 et 8 respectivement). La bande qui migre le plus lentement sur le gel (ligne 9) correspond au premier édifice comportant trois complexes de ruthénium. Il est formé d'un complexe de ruthénium central, de deux duplexes ADN de 14 paires de base et de deux complexes périphériques.

Les autres constructions à trois complexes de ruthénium et plus, ont été mises en évidence sur le gel de polyacrylamide de la figure 6. La migration des molécules avec trois complexes métalliques distants de 14, 20 et 24 paires de bases respectivement est montrée aux lignes 6, 7 et 8. Celle-ci diminue au fur et à mesure que la longueur de la double hélice augmente. La formation de ce même type d'édifice à partir des molécules hybrides **7b** et **8b** fonctionnalisées par deux oligonucléotides de 34 et 58 bases nucléiques est mise en évidence sur les lignes 9 et 11. Les assemblages linaires à cinq et sept complexes de ruthénium sont visibles sur les lignes 10 et 12. Ce gel de polyacrylamide prouve l'efficacité et la spécificité de l'hybridation avec la présence d'une bande très majoritaire pour l'ensemble des édifices formés.

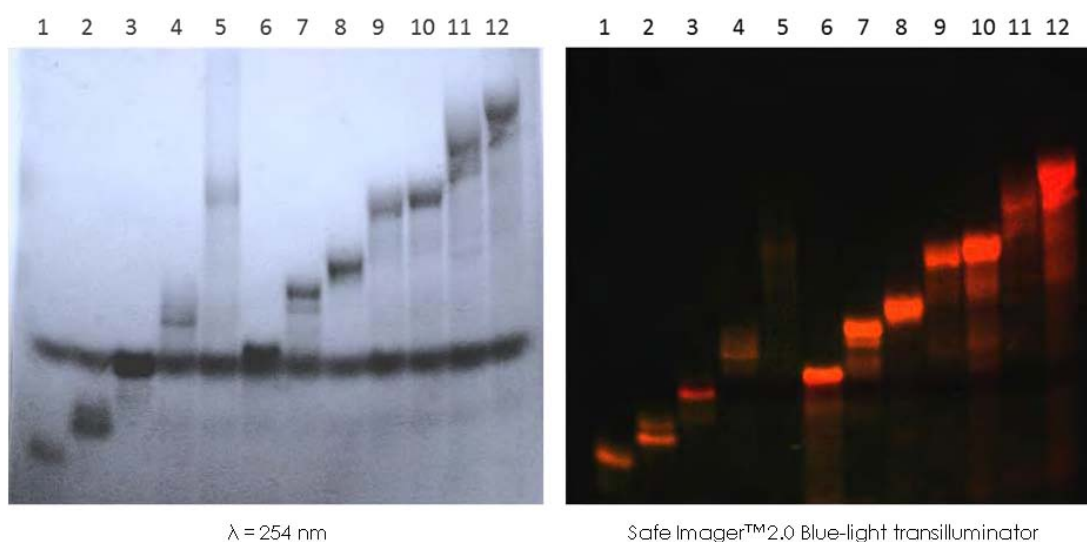


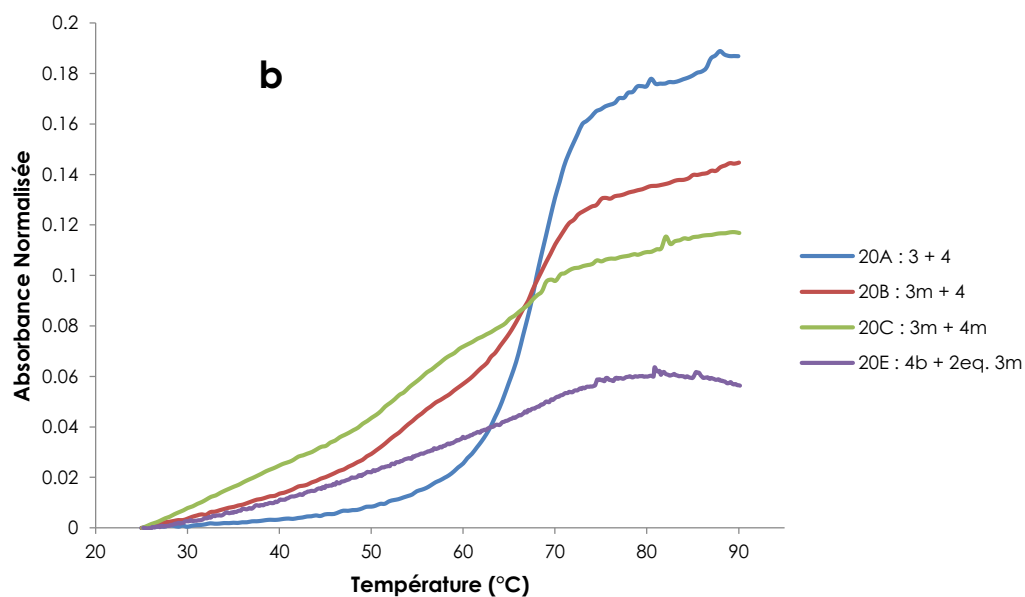
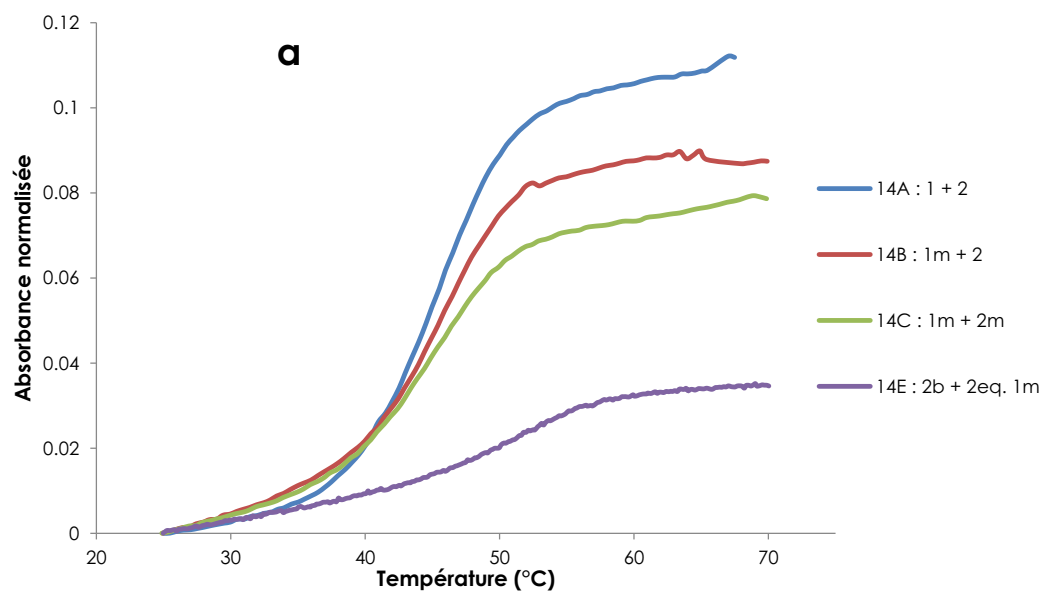
Figure 6 - Gel de polyacrylamide (20%) en condition native de tous les assemblages moléculaires obtenus à partir de complexes de ruthénium liés à 2 ODNs de 14, 20, 24, 34 et 58 bases. Lignes (1) : **2b** ; (2) : **4b** ; (3) : **6b** ; (4) : **7b** ; (5) : **8b** ; (6) : **2b + 2 eq. 1m** ; (7) : **4b + 2 eq. 3m** ; (8) : **6b + 2 eq. 5m** ; (9) : **7b + 2 eq. 1 + 2 eq. 3m** ; (10) : **7b + 2 eq. 1m + 2 eq. 3m** ; (11) : **8b + 2 eq. 1 + 2 eq. 3 + 2 eq. 5m** ; (12) : **8b + 2 eq. 1m + 2 eq. 3m + 2 eq. 5m**.

1.2.2. Température de dénaturation

La température de dénaturation, aussi appelée température de demi-dissociation (T_m de l'anglais *melting temperature*.) est une donnée importante pour quantifier la stabilité des doubles brins nucléiques. Cette température correspond à la température à laquelle 50 % des bases nucléiques sont hybridées ou déshybridées. Dans notre cas, la mesure de cette température nous a permis d'analyser si l'adjonction de complexes de ruthénium dans les structures était un facteur de stabilisation ou de déstabilisation des duplexes formés.

La température de demi-association est obtenue en mesurant, à $\lambda = 260$ nm, l'absorbance des solutions en fonction de la température. Lors de l'hybridation, l'absorbance diminue du fait du π -stacking des bases nucléiques et inversement lors de la dénaturation des duplexes. Ainsi en suivant les variations de l'absorbance en fonction de la température du milieu, la formation et la destruction d'une double hélice peuvent être suivies.

Les courbes obtenues pour les assemblages linéaires comportant des doubles brins à 14 (Figure 7 a), 20 (Figure 7 b), 24 (Figure 7 c), 34 et 58 (Figure 7 d) paires de bases sont présentées ci-dessous.



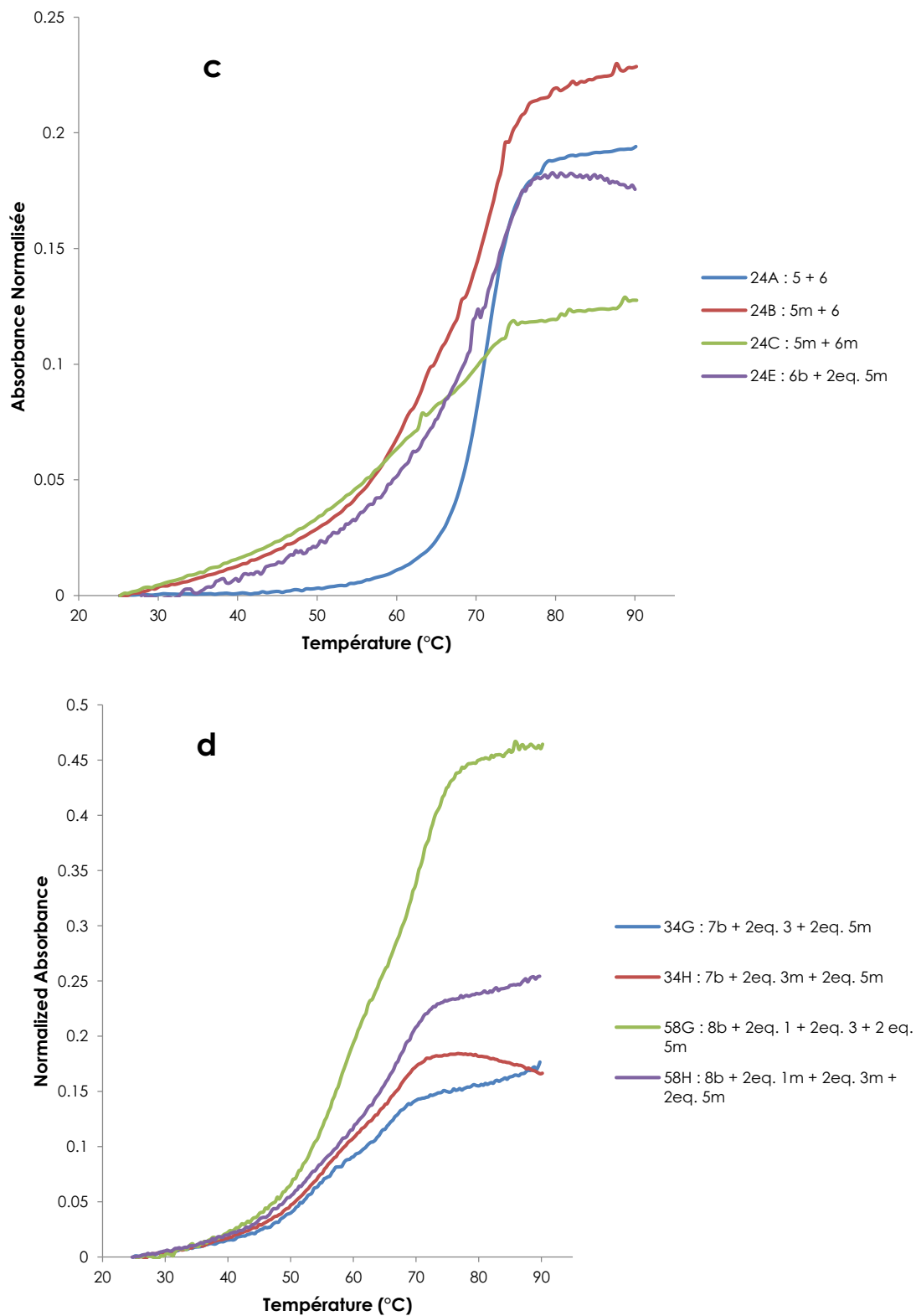


Figure 7 – Courbes de l'absorbance à $\lambda = 260$ nm en fonction de la température des différents assemblages linéaires à bases d'ODNs de 14 (a), 20 (b), 24 (c), 34 et 58 (d) bases.

De ces courbes ont été extraites les valeurs des T_m des différents assemblages linéaires. Elles sont données dans la Table 2.

Nombre de bases	Assemblages linéaires			T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)
	Type d'édifice	Nombre de Ru	Assemblages		
14	A	0	1 + 2	47.3	
	B	1	1m + 2	48	
	C	2	1m + 2m	48	
	E	3	2eq. 1m + 2b	51	
20	A	0	3 + 4	68	
	B	1	3m + 4	67.5	
	C	2	3m + 4m	68.5	
	E	3	2eq. 3m + 4b	67.8	
24	A	0	5 + 6	71.1	
	B	1	5m + 6	72.2	
	C	2	5m + 6m	71.2	
	E	3	2eq. 5m + 6b	72.2	
34	G	2	7b + 2eq. 1 + 2eq. 3m	54	66.6
	H	5	7b + 2eq. 1m + 2eq. 3m	54	66.8
58	G	2	8b + 2eq. 1 + 2eq. 3 + 2eq. 5m	58.3	70.1
	H	7	8b + 2eq. 1m + 2eq. 3m + 2eq. 5m	-	69.0

Table 2 – Valeurs des T_m des assemblages linéaires

La première observation pouvant être faite à la lecture de la Table 2 est que la présence des complexes de ruthénium ne modifie pas significativement la valeur des T_m des structures dont les duplex sont de 14, 20 ou 24 paires de bases.

Cependant, pour les assemblages basés sur des duplex de 34 et 58 bases, les résultats montrent ici un comportement différent. En effet, les assemblages étant composés d'ODNs de différentes longueurs, les mesures de T_m ne montrent plus une seule mais plusieurs inflexions dans la courbe. Ces différentes inflexions correspondent en réalité aux différents T_m des ODNs impliqués dans l'hybridation. Il est donc normal dans le cas des ODNs de 34 bases qui sont impliqués dans deux hybridations de retrouver deux points d'inflexion. Cependant, même si la deuxième hybridation (ODNs de 20 bases) semble se faire à la même température que précédemment, la première (ODN de 14 bases) semble être à une température plus haute.

Dans le cas des assemblages basés sur des ODNs de 58 bases, il n'y a ici que deux points d'inflexion sur les courbes également. Ceci peut s'expliquer par le fait que les deux hybridations correspondant aux ODNs de 20 et 24 bases ont des valeurs de T_m très proches ($\approx 68\text{ °C}$ et $\approx 72\text{ °C}$), celles-ci étant relativement éloignées de la température d'hybridation des ODNs de 14 bases ($\approx 48\text{ °C}$). Il est à noter que l'inflexion générale des courbes devient de moins en moins marquée et qu'il est donc de plus en plus difficile de déterminer précisément les T_m et ceci même grâce au tracé de la dérivée première de la courbe – ce qui explique l'absence d'une des valeurs de T_m pour l'hybridation de l'assemblage 58H.

Cette mesure de T_m des objets permet donc de comparer les hybridations, en l'occurrence avec l'insertion de complexes de ruthénium liés aux ODNs.

Il est à noter sur ces courbes une chose importante : la température de demi-association T_m correspond à la température à laquelle 50 % des bases nucléiques sont hybridées, et les absorbances correspondant à 0 % et 100 % d'hybridation sont les paliers extrêmes des courbes. Ces valeurs extrêmes sont atteintes aisément pour le duplex de 14 paires de bases (courbe sur la Figure 7 a). Mais lorsque l'on regarde les courbes correspondant à l'hybridation des structures contenant du ruthénium, les pentes sont moins marquées et les paliers plus difficiles à se mettre en place. Il est donc probable que les complexes de ruthénium ralentissent l'hybridation par gêne stérique, ralentissant l'hybridation des bases les plus proches des complexes.

Les valeurs de T_m que nous observons pour les assemblages à base d'ODNs de 14 à 24 bases comprenant de 1 à 3 complexes de ruthénium, sont cohérentes avec les valeurs des températures T_m des ODNs seuls. Cette indication nous montre que l'hybridation est similaire qu'il y ait présence de complexes de ruthénium ou non. La principale différence réside dans la vitesse et l'accessibilité de l'hybridation comme nous venons de le voir : l'hybridation totale des duplex semble plus difficile à atteindre lorsque des complexes de ruthénium leur sont liés.

Le fait que l'hybridation semble ralentie par la présence de complexes de ruthénium est la seule conséquence visible d'un quelconque changement physico-chimique des duplex. En effet, des analyses différentes sur ces assemblages moléculaires nous ont montré qu'il n'y avait pas d'autre changement dans leurs configurations.

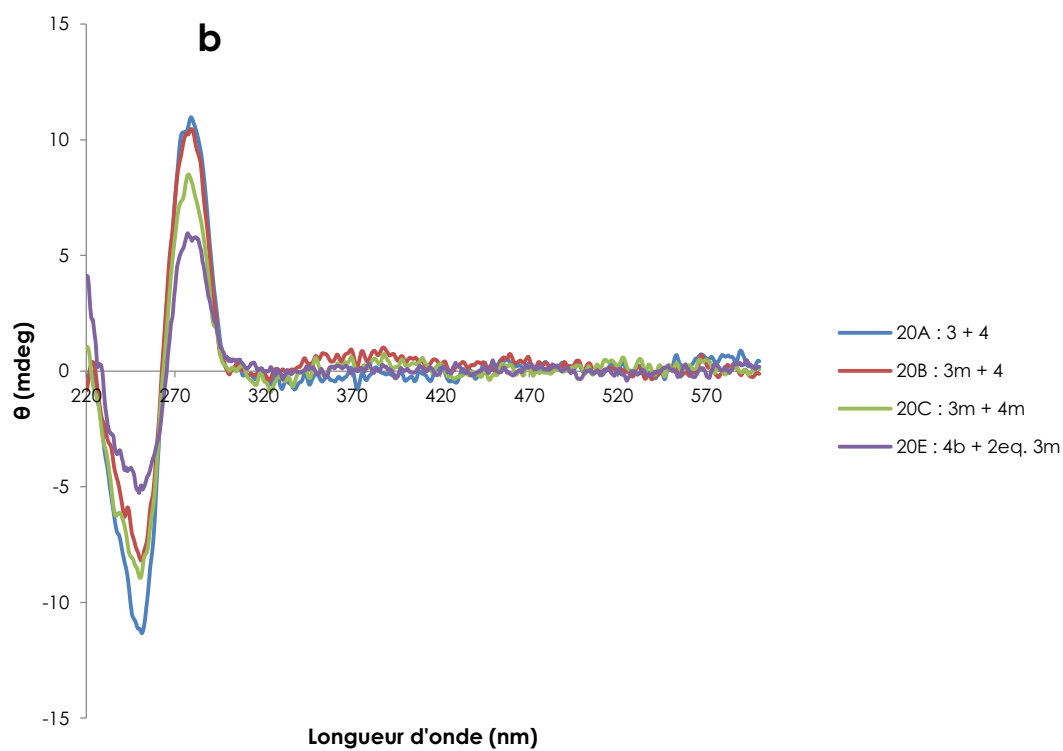
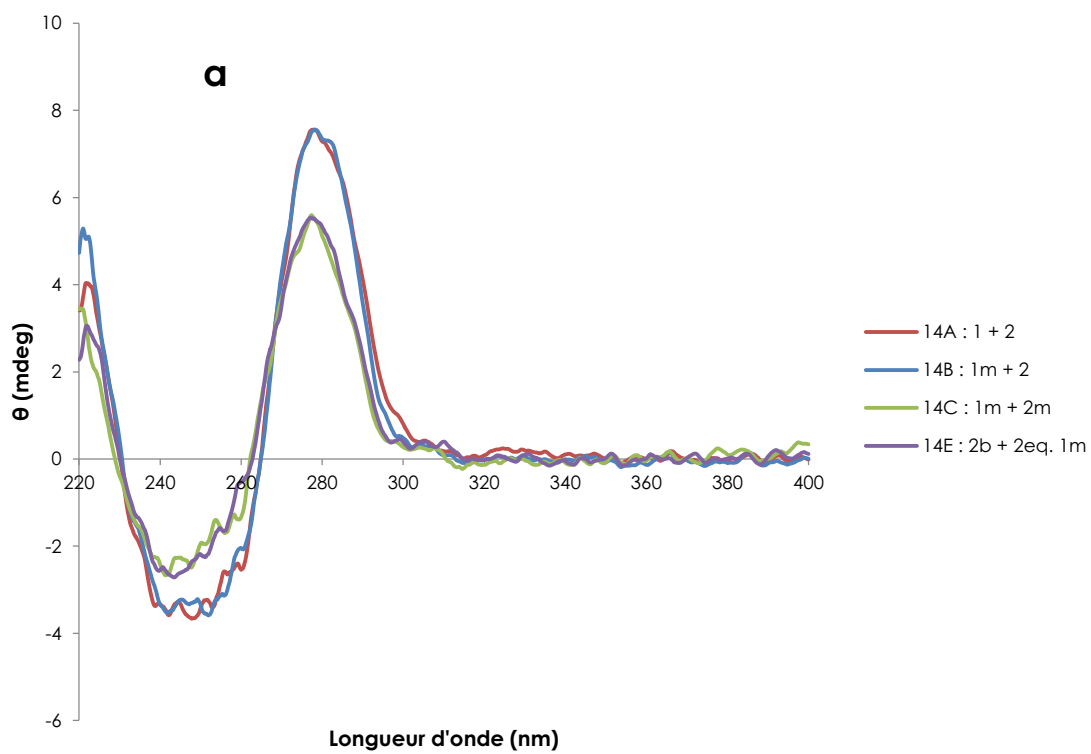
1.2.3. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire permet de mesurer un angle de polarisation de la lumière après avoir traversé une solution. Les molécules biologiques en général, mais ici plus précisément l'ADN, sont des molécules optiquement actives. La décomposition de la lumière en deux ondes circulaires – une gauche et une droite – permet de mesurer la déviation de l'une ou l'autre de ces composantes après avoir traversé un milieu contenant des molécules optiquement actives – ici les double-brins d'ADN. Dans les longueurs d'onde de l'UV, cette déviation de la polarisation de la lumière au travers de duplexes d'ADN a une forme caractéristique en fonction de l'hélice concernée, A, B ou Z pour citer les formes principales des duplex.

Les spectres de dichroïsme circulaire des assemblages moléculaires formés ont été réalisés afin de connaître la forme générale adoptée par les duplexes des édifices et l'influence de la présence des complexes de ruthénium sur celle-ci.

L'ensemble des spectres présente un spectre caractéristique de la forme B avec une bande positive à 282 nm et une bande négative à 252 nm (Figure 8). Pour les édifices composés de complexes de ruthénium, aucun signal n'a été observé près de la bande MLCT du complexe de ruthénium. La présence d'un centre métallique dans la partie centrale et/ou périphérique des constructions n'affecte par le signal et donc la forme des duplexes.

Chapitre 3



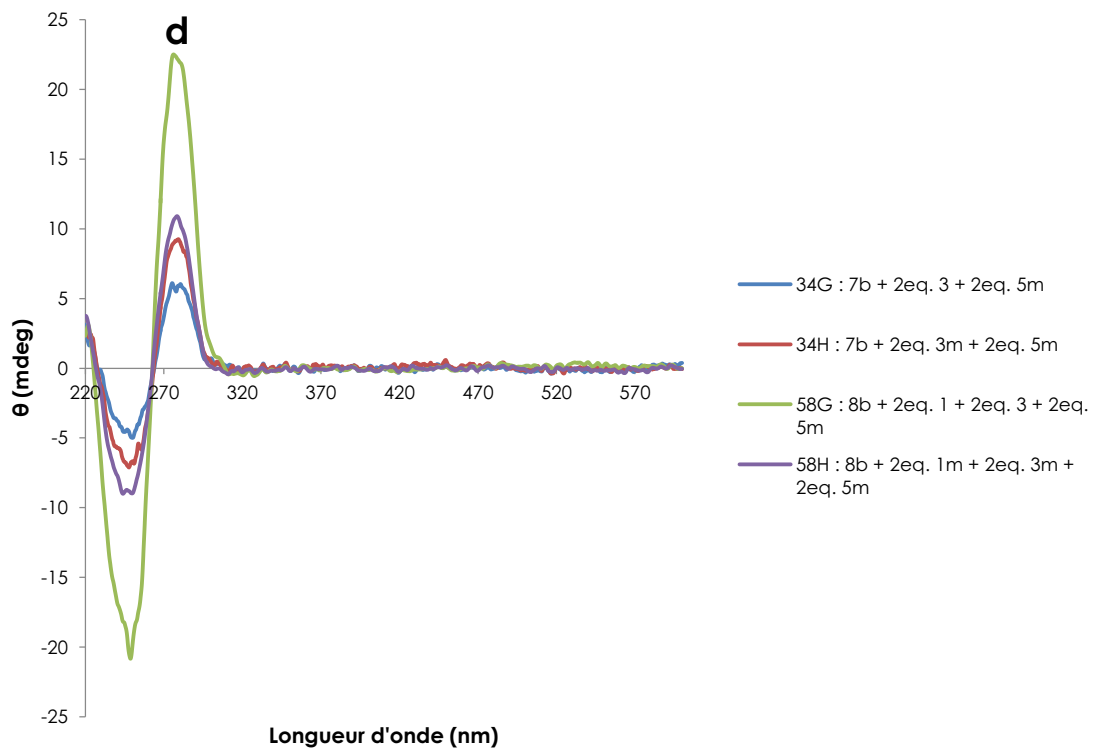
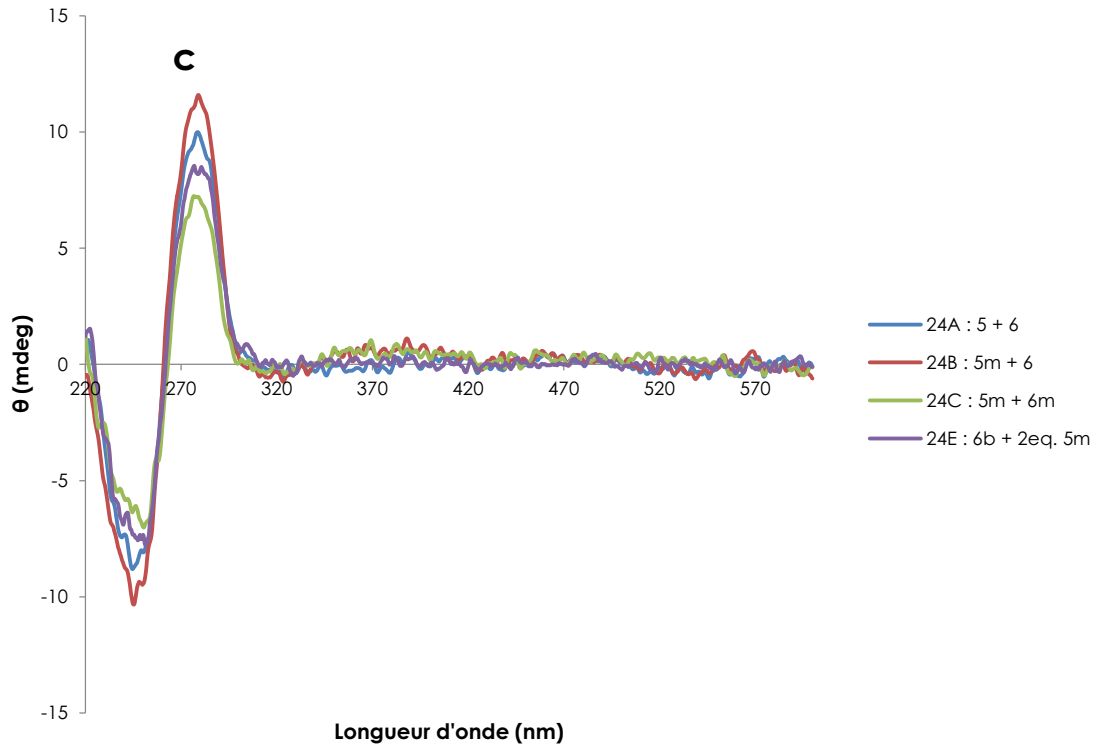


Figure 8 – Dichroïsme circulaire des assemblages moléculaires linéaires obtenus avec des ODNs de 14 (a), 20 (b), 24 (c), 34 et 58 (d) bases.

1.2.4. Spectrophotométrie de luminescence

Les spectres de fluorescence ont été obtenus pour une longueur d'onde d'excitation de 458 nm. Les spectres d'émission des assemblages – qui provient de la phosphorescence des complexes de ruthénium – montre un léger décalage des longueurs d'onde. En effet, selon que le complexe de ruthénium soit lié à un ou deux ODNs, l'émission est décalée vers le rouge. Pour le complexe lié à un ODN, une émission à 669 nm est observée et pour le complexe de ruthénium lié à deux ODNs elle se situe à 677 nm. L'émission des assemblages formée est une résultante des émissions des différents complexes de ruthénium des structures.

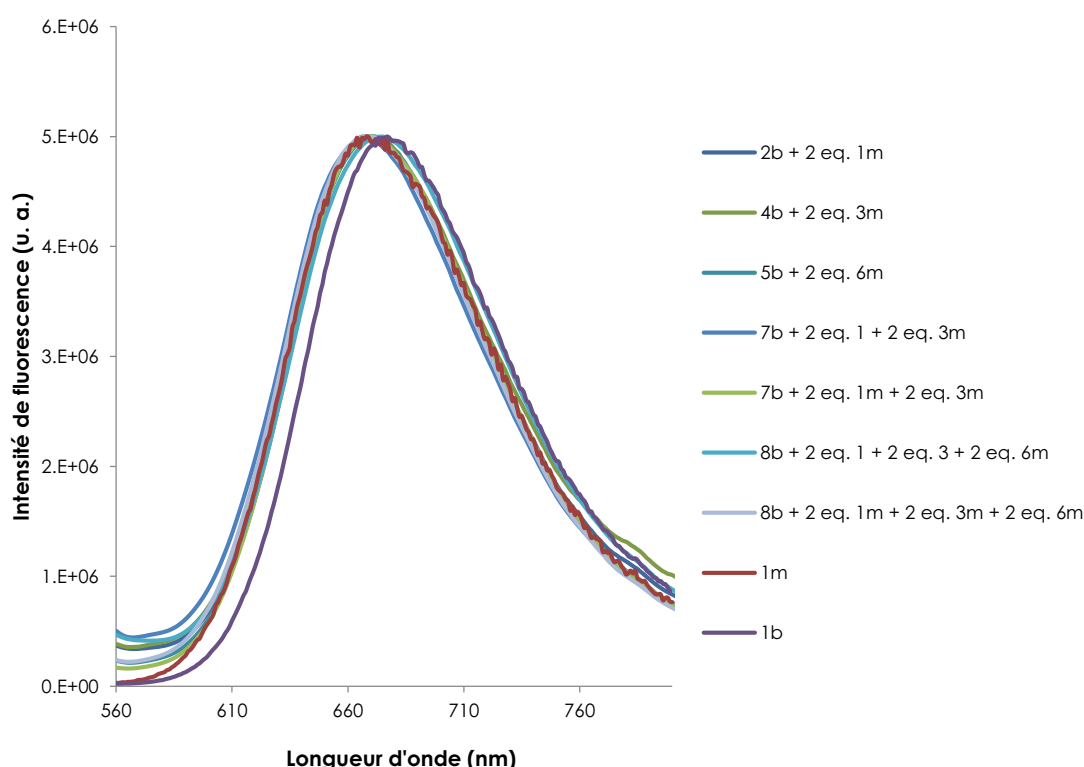


Figure 9 – Spectres de fluorescence normalisés des assemblages à base d'ODNs de 14, 20, 24, 34 et 58 nucléotides.

1.3. Conclusion sur les assemblages linéaires

L'utilisation de la famille de molécules hybrides Ruthénium/ODN obtenue par la réaction d'amidation nous a permis de construire une bibliothèque d'assemblages moléculaires linéaires. Ces assemblages comportent de 1 à 7 complexes de ruthénium positionnés de manière contrôlée sur des duplex d'ADN. Les duplex

de ces assemblages adoptent une forme B. Les différentes méthodes de caractérisation ont montré que la présence des complexes de ruthénium ne modifie pas significativement la structure de la double-hélice.

À partir de ces mêmes composés hybrides de départ, de nouveaux assemblages ont été formés dont la structure de base est une jonction à trois branches.

2. Assemblages en étoile

L'objectif de cette partie a été la formation d'assemblages moléculaires en forme d'étoile à base d'oligonucléotides et comportant des complexes de ruthénium à ces extrémités ou en son centre. Pour cela, nous avons utilisé le même principe que la nature utilise lorsqu'elle forme des jonctions de *Holliday*, c'est à dire l'hybridation de plusieurs simples brins complémentaires deux à deux sur seulement une partie de leurs séquences. Dans notre cas, nous avons élaboré des séquences ADN afin de former une structure à trois branches (Figure 10). Cette structure est la base des édifices sur lesquels ont été insérés les complexes métalliques.

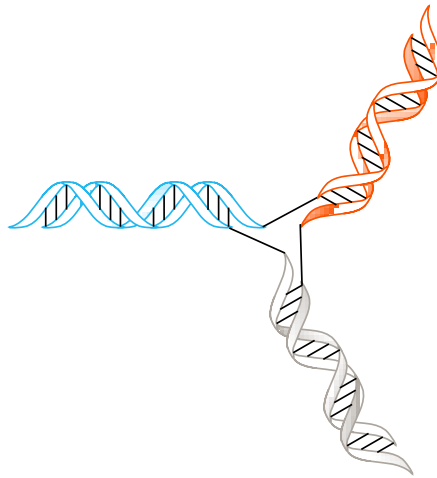


Figure 10 – Structure en étoile à trois branches.

2.1. Synthèses des assemblages en étoile

2.1.1. Utilisation d'oligonucléotides modifiés

L'assemblage de plusieurs ODNs peut mener à la formation d'une étoile à trois branches. En effet, si l'on prend trois oligonucléotides dont chaque moitié est complémentaire des deux voisins, leur hybridation permet la formation de trois doubles hélices dont la disposition spatiale est celle d'une étoile à trois branches (Figure 10).

Dans la littérature, la partie centrale des jonctions peut être composée de bases nucléiques appariées¹ ou de molécules organiques.² Pour ce projet, nous avons choisi d'insérer une chaîne carbonée de 12 carbones. Huit simples brins ont été réalisés **12-19** (Table 3). Chaque séquence est composée de trois parties: une première séquence ADN, une chaîne dodecane interne et un second oligonucléotide non complémentaire au premier. Les trois premiers ODN, **12**, **13** et **14**, possèdent six séquences distinctes complémentaires deux à deux (orange, gris et bleu clair) (Table 3). Sur les cinq oligonucléotides suivants, **15-19**, nous avons prolongé les deuxième séquences par des simples brins non complémentaires qui serviront de *sticky ends* (Table 3).

Nu- méro ODN	Nombre de bases	Oligonucléotides
12	19	5'-TGT GAC AAG CC - C ₁₂ - AGT CGC CG-3'
13	21	5'-CGG CGA CT - C ₁₂ - CCG CTT CTG GAA G-3'
14	24	5'-CTT CCA GAA GCG G - C ₁₂ - GGC TTG TCA CA-3'
15	33	5'-TGT GAC AAG CC - C ₁₂ - AGT CGC CG CGT ACT GAA GAC CT-3'
16	35	5'-CGG CGA CT - C ₁₂ - CCG CTT CTG GAA G CGT ACT GAA GAC CT-3'
17	38	5'-CTT CCA GAA GCG G - C ₁₂ - GGC TTG TCA CA CGT ACT GAA GAC CT-3'
18	43	5'-TGT GAC AAG CC - C ₁₂ - AGT CGC CG GTA GCA AGC CTG CCT CTG AGT CCG-3'
19	44	5'-CTT CCA GAA GCG G - C ₁₂ - GGC TTG TCA CA CTC ATG CAG CGT CGA GTC TC-3'

Table 3 – Séquences nucléiques utilisées pour la construction des assemblages en étoile.

2.1.2. Conditions d'hybridation

Les conditions d'hybridation utilisées pour former les structures en étoile sont les mêmes que celles utilisées pour les assemblages linéaires. Elles ont consisté à mélanger le nombre approprié d'équivalents de chaque ODNs nus ou liés à un complexe de ruthénium dans un milieu tamponné à pH = 7,2 composé de $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ Tris, $100 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl et $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ MgCl_2 pour une concentration finale de $20 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Les solutions ont été chauffées à $90 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant trois minutes puis laissées revenir lentement à température ambiante. Enfin, les mélanges ont été mis à quatre degrés pendant 12 heures.

2.1.3. Assemblages utilisant des complexes de ruthénium mono-ODN

L'hybridation d'un équivalent des oligonucléotides **12**, **13** et **14** conduit à la formation d'une structure en étoile à trois branches (Figure 11).

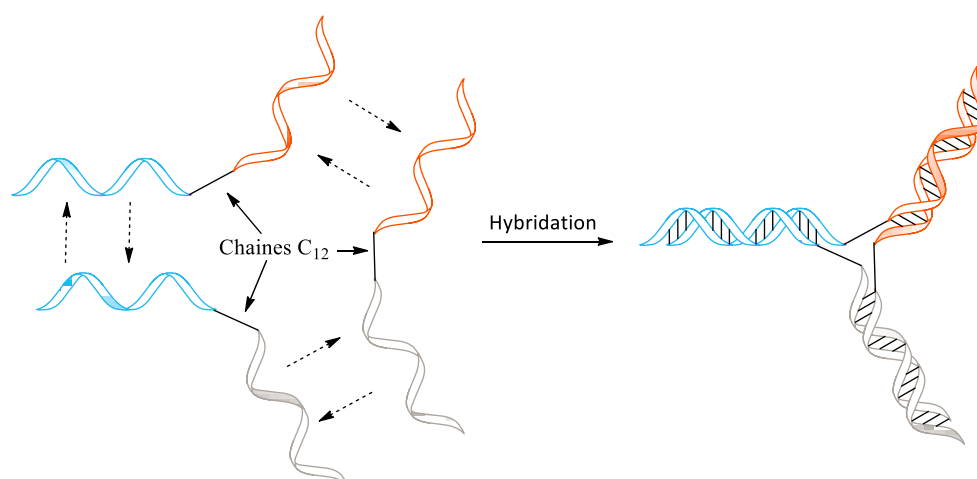


Figure 11 – Synthèse d'une jonction à trois branches par hybridation de 1 équivalent de **12**, **13** et **14**.

Cette jonction à trois branches ne permet pas d'envisager d'autres structures par accroissement ou adjonction d'autres parties. Pour induire la construction des assemblages en étoiles envisagés, nous avons inséré des bouts collants ou *sticky ends* dans la structure. En effet, ce sont des simples brins ODN qui restent non-appariés lors de la formation de la jonction et qui laissent la possibilité d'hybridations futures avec les complexes métalliques hybrides Ru-mono ou bis ODNs.

La structure en étoile avec trois bouts collants identiques est réalisée en hybridant un équivalent des séquences **15**, **16** et **17** (Figure 12). La séquence du sticky ends est de 14 bases nucléiques et elle correspond à celle de la séquence **2** utili-

sée dans le paragraphe précédent. La synthèse de la brique d'assemblage Ruthénium-mono ODN **1m** et la présence de *sticky ends*, nous ont donc permis d'envisager leurs hybridations et donc de former une jonction à trois branches possédant en périphérie de 1 à 3 complexes de ruthénium (Figure 13).

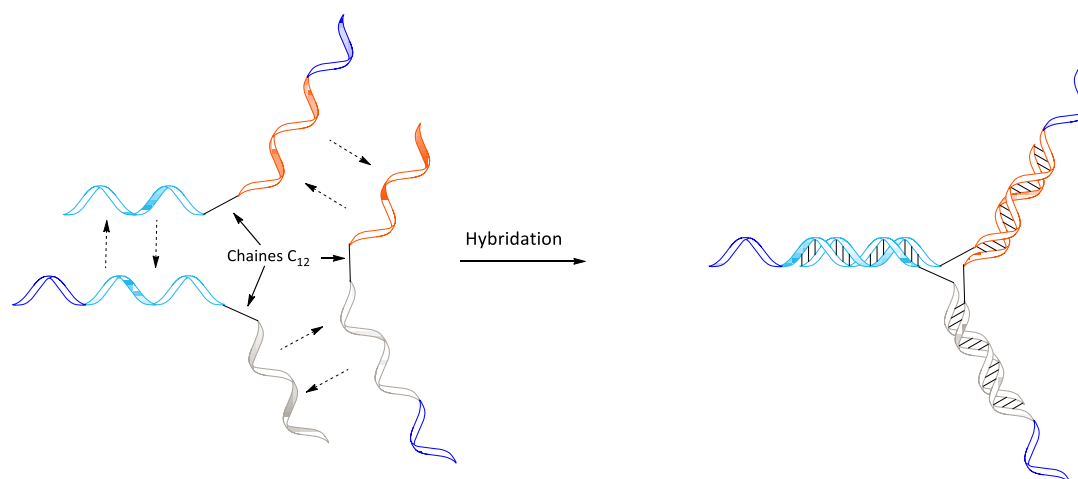


Figure 12 – Formation d'un assemblage en étoile à trois branches d'ADN avec des *sticky ends* identiques en périphérie.

Ainsi, dans les mêmes conditions d'hybridation que celles du mélange précédent (un équivalent de **15**, **16** et **17**) et en y ajoutant trois équivalents de **1m**, on obtient un assemblage en étoile avec trois complexes de ruthénium en périphérie (Figure 13 c).

Pour obtenir, une jonction à trois branches avec deux complexes de ruthénium, il suffit de substituer un des trois oligonucléotides par son équivalent sans bout collant. Dans l'exemple montré sur la Figure 13 b, nous avons substitué **17** par **13** et donc hybridé 1 équivalent de **13**, **15** et **16** plus deux équivalents de **1m**.

Enfin, la construction d'un édifice à trois branches et composé d'un seul complexe de ruthénium a été réalisée en hybridant 1 équivalent de **12**, **13**, **17** et **1m** (Figure 13 a).

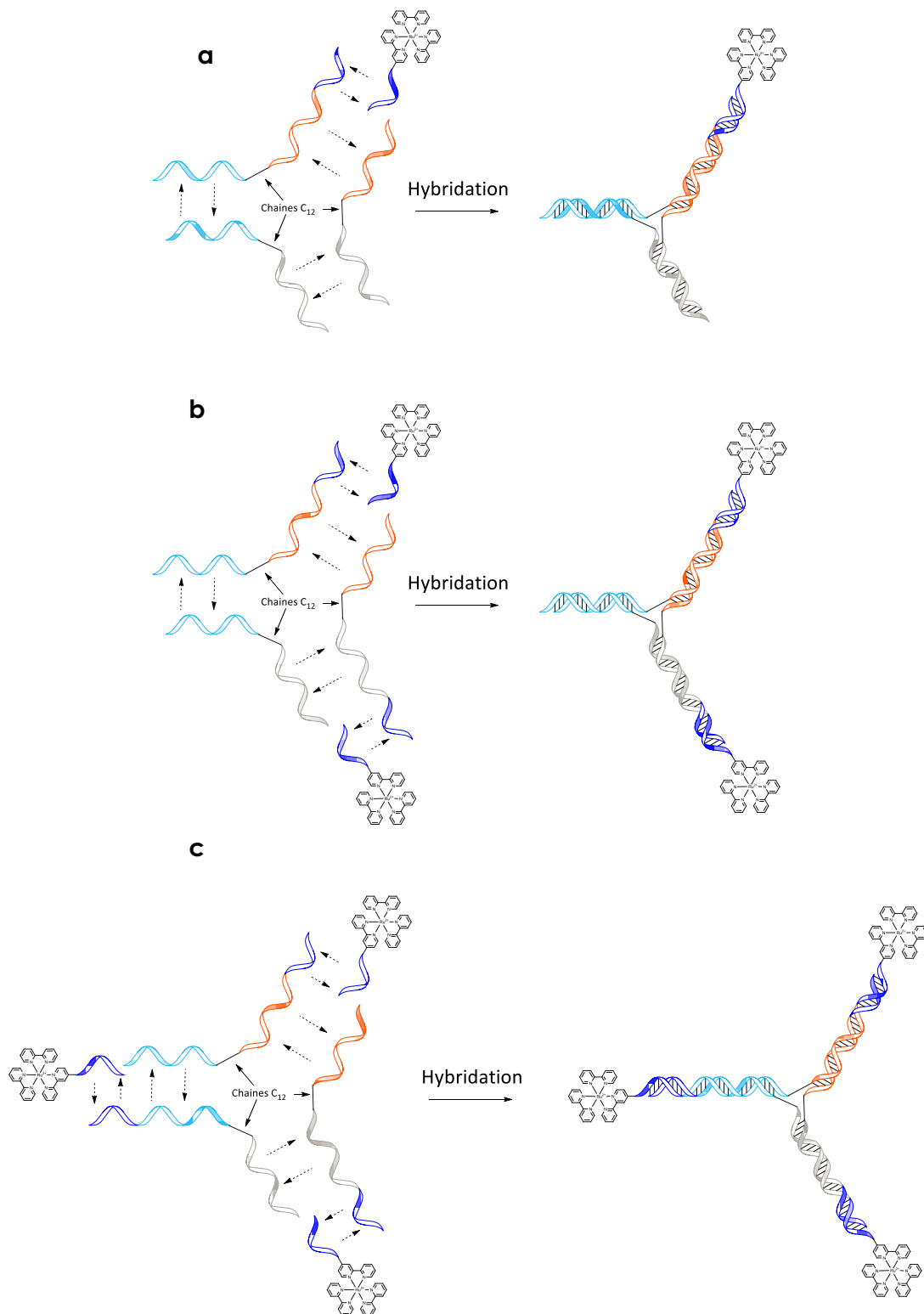


Figure 13 – Synthèses d'assemblages en étoile comportant avec un (a), deux (b) ou trois (c) complexes de ruthénium en périphérie.

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit la synthèse de trois complexes ruthénium mono-ODNs dont les séquences sont composées de 14, 20 ou 24 bases.

Nous avons ainsi la possibilité d'insérer en périphérie des étoiles des complexes de ruthénium non seulement par l'hybridation de **1m**, mais aussi par l'hybridation des molécules hybrides **3m** et **5m** de 20 et 24 bases respectivement. Pour cela, deux autres ODNs **19** et **18** ont été synthétisés donc les *sticky ends* sont complémentaires respectivement de **3m** et **5m**.

Les différentes combinaisons des brins **12**, **13**, **14**, **16**, **18**, **19**, **1m**, **3m** et **5m** ont induit la formation de nouvelles structures à trois duplex avec en périphérie des complexes de ruthénium dont le nombre peut varier de 1 à 3 et dont l'insertion s'est faite par l'hybridation de trois bouts collants différents par la longueur de leur séquence (14, 20 ou 24 bases). Dans la Figure 14, nous avons illustré l'une d'entre elles. Elle est issue de l'hybridation de 1 équivalent de **16**, **18**, **19**, **1m**, **3m** et **5m**. Elle possède trois complexes métalliques dont l'incorporation a été obtenue par association de brins de trois longueurs distinctes de 14, 20 et 24 bases.

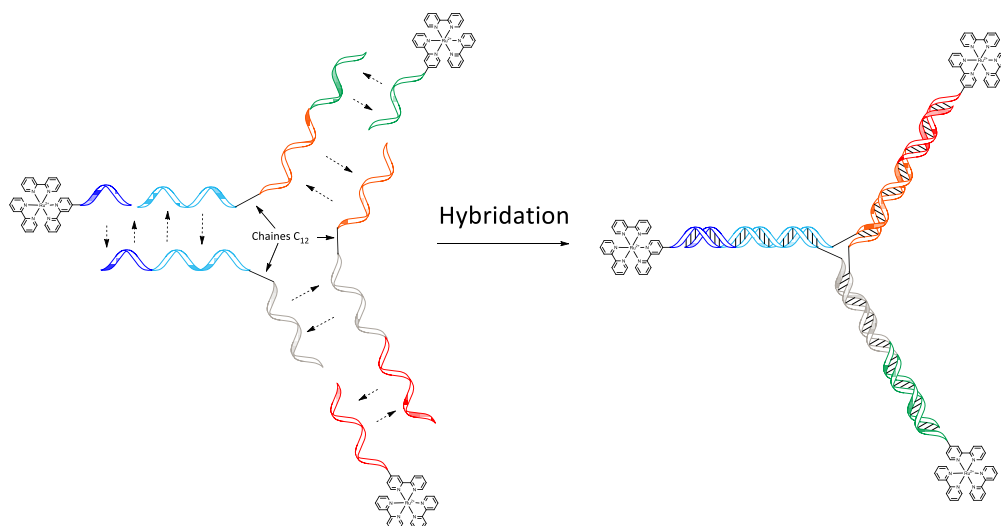


Figure 14 – Synthèse de l'assemblage en étoile composé de 3 *sticky ends* différents de 14, 20 et 24 bases et comportant 3 complexes de ruthénium en périphérie.

2.1.4. Assemblages utilisant des complexes de ruthénium bis-ODN

Dans le paragraphe précédent, nous avons décrit la synthèse de différents assemblages à trois branches comportant des complexes de ruthénium en bout des doubles hélices et issus de l'hybridation avec des complexes de ruthénium-mono ODN.

Pour accroître la diversité des structures formées et leur taille, et pour moduler le nombre de complexes de ruthénium et leur position sur les assemblages, nous

avons utilisé les complexes de ruthénium fonctionnalisés par deux oligonucléotides **Xb**. En effet, en jouant sur la complémentarité des séquences des *sticky ends* avec celles des complexes ruthénium-bis ODNs, il nous a été possible de coupler deux structures en étoile (Figure 15). Ces assemblages à trois branches doubles peuvent comporter ou non des *sticky ends* périphériques (Figure 15 et Figure 16). Par contre, ces *sticky ends* doivent avoir des séquences différentes de celle utilisée pour la liaison des deux étoiles.

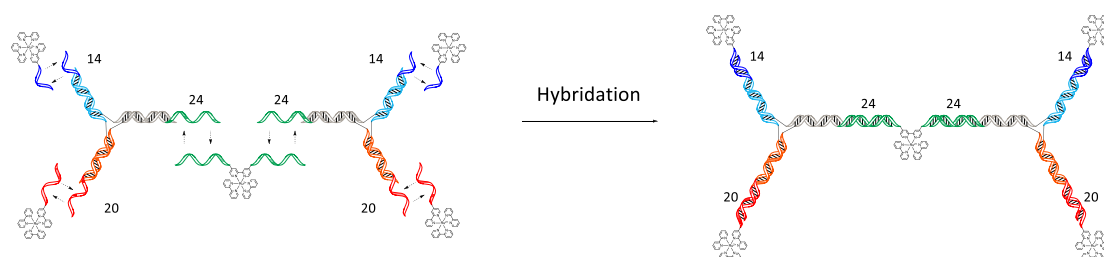


Figure 15 - Assemblage de deux structures en étoile à trois branches d'ODNs par le biais de *sticky ends* et d'un complexe de ruthénium lié à deux ODNs complémentaires longs de 24 bases.

Les premiers édifices doubles formés sont issus du couplage de deux structures en étoile identiques comportant un seul bout collant et du complexe ruthénium bis-ODN complémentaire. Ainsi l'assemblage de deux étoiles à trois branches par un espaceur composé de deux fois 14 paires de bases et d'un complexe de ruthénium a été obtenu par hybridation de 2 équivalents de **12**, **13** et **17** et 1 équivalent de **1b**. Les constructions équivalentes en 20 et 24 paires de bases sont réalisées en hybridant 2 équivalents de **12**, **13** et **19** et 1 équivalent de **3b**, et 2 équivalents de **13**, **14** et **18** et 1 équivalent de **6b** respectivement.

La substitution des séquences ne contenant pas de *sticky ends* par celles en contenant permet l'agrandissement des branches périphériques lors de la formation des doubles hélices et l'insertion de complexes métalliques (Figure 16). Pour ces objets, nous avons utilisés uniquement les doubles étoiles avec le complexe de ruthénium central de 24 bases **6b**. Ainsi, l'hybridation de différentes compositions de séquences ADN disponibles a permis la formation d'édifices doubles avec quatre bouts collants de 14 bases (Figure 16 a), avec deux bouts collants de 14 et de 20 bases chacun (Figure 16 a') et avec quatre duplexes ADN (Figures 16 b et b') ou avec quatre complexes de ruthénium périphériques (Figures 16 c et c') issus de l'hybridation des *sticky ends* de 14 et de 20 bases. Par exemple, les Figures 16 a', b' et c' illustrent les assemblages obtenus par l'hybridation de 2 équivalents de **16**, **18** et **19** et 1 équivalent de **5b** (16a') plus 2 équivalents de **1** et **3** (16 b') ou 2 équivalents de **1m** et **3m** (16 c').

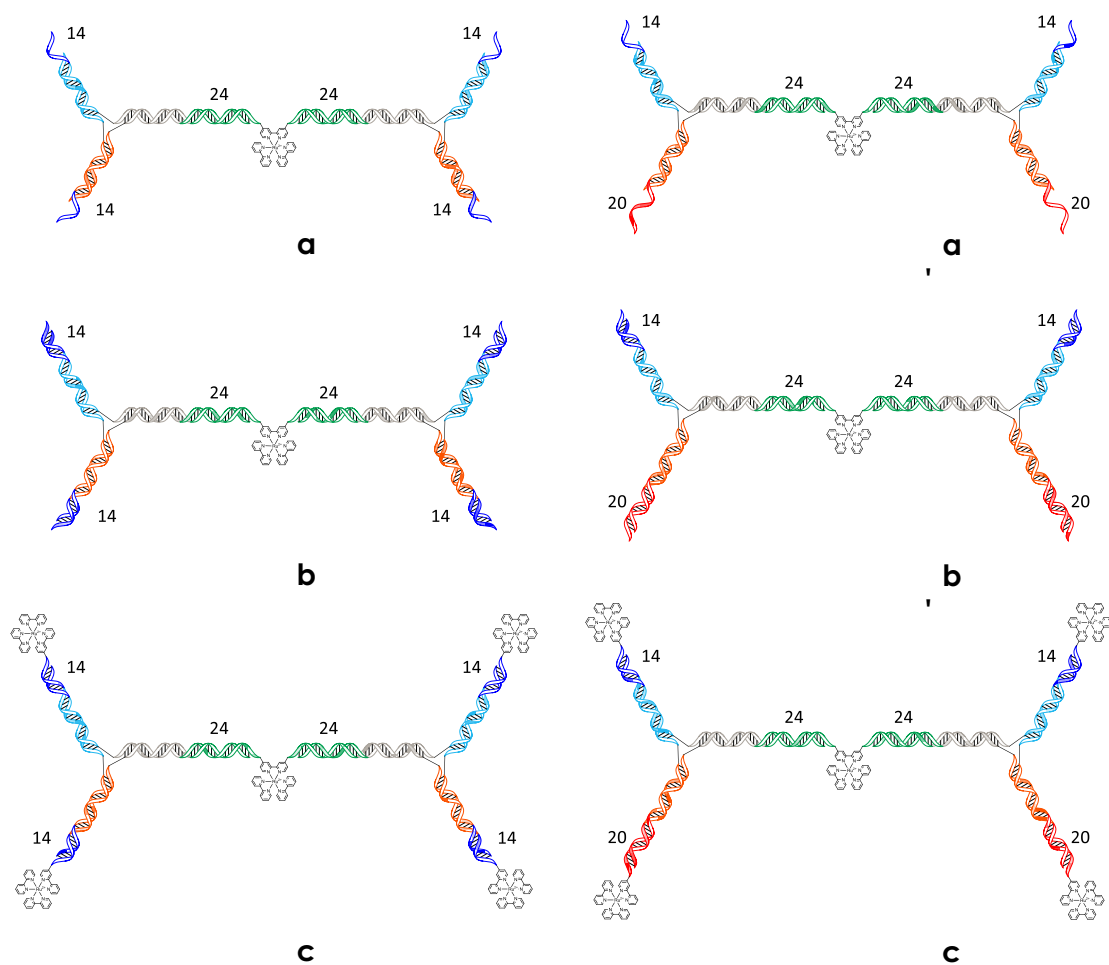


Figure 16 – Assemblages en double-étoiles à trois branches composés de simples brins (a et a'), de doubles hélices (b et b') et de complexes de ruthénium (c et c') en périphérie.

La caractérisation de ces structures s'est faite de la même manière que dans le cas des structures linéaires précédentes par UV, dichroïsme circulaire et électrophorèse PAGE.

2.2. Caractérisations des assemblages en étoile

2.2.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

La formation des assemblages en étoile a été mise en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) en condition native à 7 °C. La visualisation des bandes des structures formées est obtenue par illumination des gels de polyacrylamide à deux longueurs d'onde $\lambda = 254\text{nm}$ et $\lambda = 365\text{nm}$ et à l'aide d'une table d'illumination Safe Imager™. A cette dernière longueur d'onde, seuls les édifices portant un ou des complexes de ruthénium sont visibles.

Le gel de la figure 17 présente sur les lignes 1 à 6, la migration des différentes séquences ODN utilisées **12** à **17**. La ligne 7 montre la bande correspondante à l'hybridation de 1 équivalent de **12**, **13** et **14** et à la formation du premier assemblage à trois branches. La formation de cette structure en étoile est très efficace et spécifique puisque une seule bande est observée. Son analogue avec trois *sticky ends* identiques de 14 bases (ligne 8) montre toujours une seule bande et une migration ralentie sur le gel de polyacrylamide par l'ajout de brins plus longs.



Figure 17 - Gel de polyacrylamide à 15 % en condition native à $\lambda = 254$ nm des assemblages en étoile. Lignes (1) : **12** ; (2) : **13** ; (3) : **14** ; (4) : **15** ; (5) : **16** ; (6) : **17** ; (7) : **12 + 13 + 14** ; (8) : **15 + 16 + 17**.

Dans le gel précédent, nous avons montré la présence de trois bouts collants à la périphérie de la structure en étoile. Nous avons aussi pu moduler leur nombre et ainsi moduler le nombre de complexes de ruthénium dans l'assemblage. En effet, l'hybridation d'un équivalent de **12**, **13** et **17** conduit à la formation d'une étoile à trois branches avec un seul *sticky end* et avec un seul complexe de ruthénium en périphérie par hybridation avec un équivalent de **1m**. De la même manière, en substituant **12** et **13** par **16** et **17**, on obtient deux étoiles avec deux et trois *sticky ends*. L'insertion de deux et trois équivalents de **1m** permet d'obtenir une étoile avec deux et trois complexes de ruthénium en périphérie. C'est ce qui est démontré dans le gel de la Figure 18. Les lignes 3, 4 et 5 montrent les constructions à trois branches avec respectivement 1, 2 et 3 complexes de ruthénium. L'insertion des complexes de ruthénium est visible sur le gel grâce au Safe Imager™.

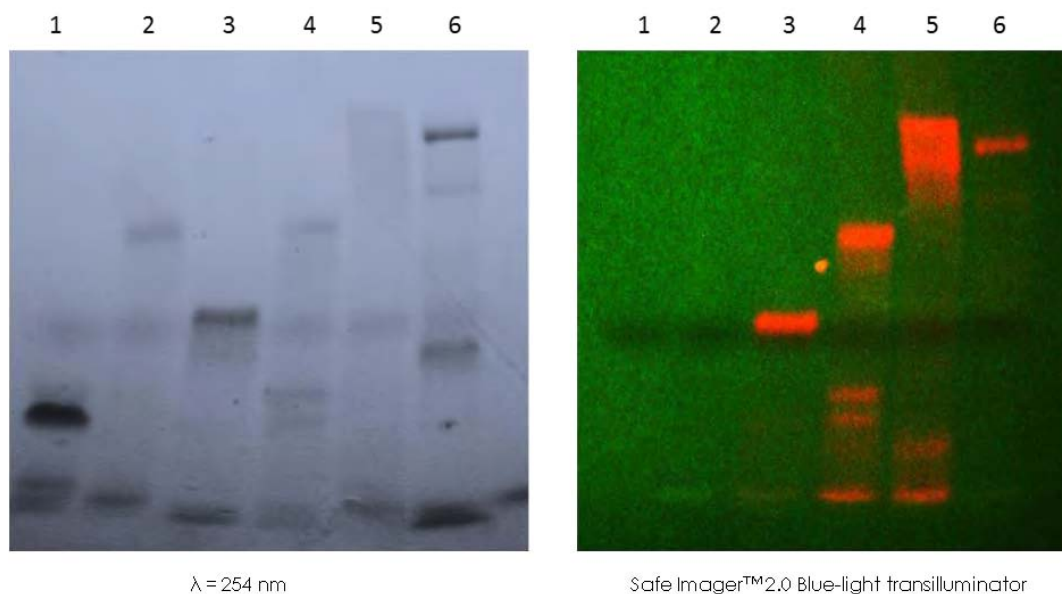


Figure 18 – Gel de Polyacrylamide (10 %) en condition native à $\lambda = 254$ nm (gauche) et sur Safe Imager™ 2.0 Blue-light transilluminator (droite) des assemblages à trois branches. Lignes (1) : **12 + 13 + 14** ; (2) : **15 + 16 + 17** ; (3) : **12 + 13 + 17 + 1 eq. 1m** ; (4) : **12 + 16 + 17 + 2 eq. 1m** ; (5) : **15 + 16 + 17 + 3 eq. 1m** ; (6) : **2 eq. 12 + 2 eq. 13 + 2 eq. 17 + 1b**.

Sur ce même gel, la ligne 6 correspond à la formation d'une structure en double étoile. Aux deux étoiles à trois branches issues de l'hybridation de deux équivalents de **12**, **13** et **17** et possédant chacune un seul *sticky end* de 14 bases, a été ajouté le complexe Ru-bis ODNs **1b** dont la séquence est complémentaire aux *sticky ends*. L'hybridation de deux séquences de **1b** avec les *sticky ends* des deux jonctions à trois branches induit la formation d'un assemblage en double-étoile. On retrouve cette même construction à la ligne 6 de la Figure 19.

Sur ce nouveau gel, les cinq premières lignes correspondent à des assemblages en étoile simple. Elles sont sans *sticky end* (ligne 1), avec trois *sticky ends* de 14 bases (ligne 2), avec trois complexes de ruthénium introduit par hybridation avec **1m** (ligne 3), avec trois *sticky ends* de 14, 20 et 24 bases (ligne 4) et à nouveau avec trois complexes de Ru mais cette fois insérés par l'hybridation avec **1m**, **3m** et **5m** (ligne 5). Ensuite, sont montrés les assemblages formés de doubles étoiles. Ils sont obtenus en hybridant des complexes de ruthénium-bis ODNs à deux structures en étoile comportant un *sticky end* de séquence complémentaire. Les lignes 6, 7 et 8 sont des constructions obtenues par hybridation de **1b**, **3b** et **5b** avec les assemblages à trois branches adéquats. On remarque l'apparition de bandes secondaires correspondantes à des défauts de construction. Les six assemblages suivants ont pour base deux étoiles à trois branches reliées par le complexe de ruthénium-bis ODNs de 24 bases **5b**. Nous avons introduits à leurs périphéries 4

sticky ends de 14 bases (ligne 9), quatre doubles brins de 14 paires de bases (ligne 10), quatre complexes de ruthénium liés à quatre duplex de 14 paires de bases (ligne 11), deux *sticky ends* de 14 bases et deux de 20 bases (ligne 12), deux duplexes de 14 paires de bases et deux de 20 paires de bases (ligne 13) et quatre complexes de ruthénium liés par deux duplexes de 14 paires de bases et deux de 20 paires de bases (ligne 14). Au fur et à mesure que les assemblages en double étoile s'agrandissent, leurs migrations diminuent et quelques défauts de construction apparaissent.

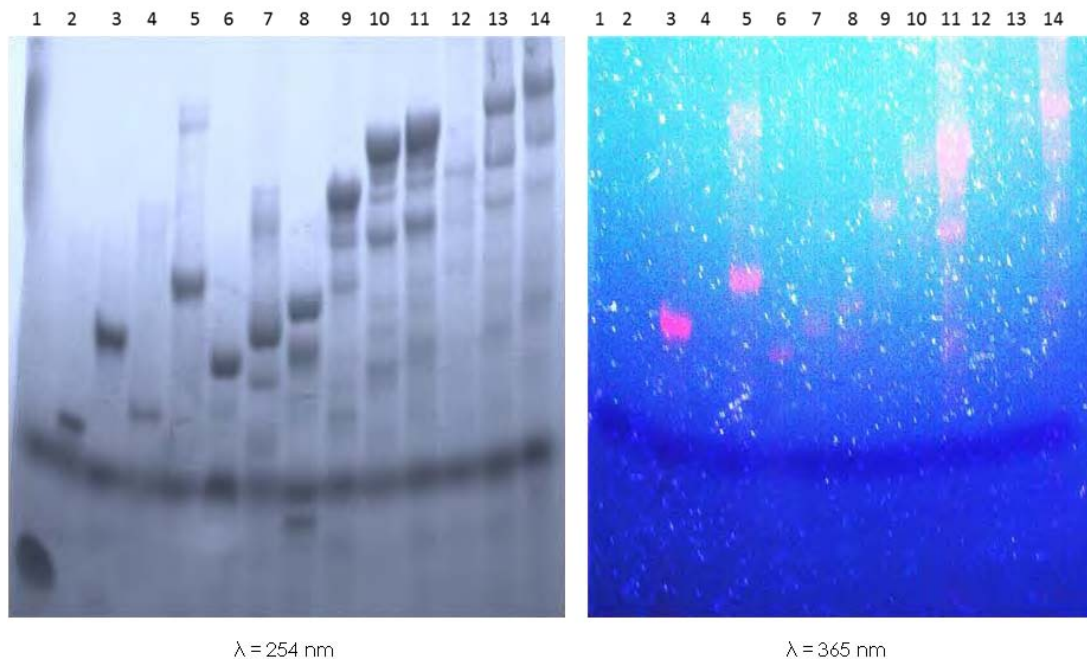


Figure 19 – Gel de Polyacrylamide (10 %) en condition native à $\lambda = 254$ nm (gauche) et à $\lambda = 365$ nm (droite) des assemblages en étoile. Lignes (1) : 12 + 13 + 14 ; (2) : 15 + 16 + 17 ; (3) : 15 + 16 + 17 + 3 eq. 1m ; (4) : 16 + 18 + 19 ; (5) : 16 + 18 + 19 + 1m + 3m + 5m ; (6) : 2 eq. 12 + 2 eq. 13 + 2 eq. 17 + 1b ; (7) : 2 eq. 12 + 2 eq. 13 + 2 eq. 19 + 3b ; (8) : 2 eq. 13 + 2 eq. 14 + 2 eq. 18 + 6b ; (9) : 2 eq. 16 + 2 eq. 17 + 2 eq. 18 + 6b ; (10) : 2 eq. 16 + 2 eq. 17 + 2 eq. 18 + 6b + 4eq. 1 ; (11) : 2 eq. 16 + 2 eq. 17 + 2 eq. 18 + 6b + 4eq. 1m ; (12) : 2 eq. 16 + 2 eq. 18 + 2 eq. 19 + 6b ; (13) : 2 eq. 16 + 2 eq. 18 + 2 eq. 19 + 6b + 2 eq. 1 + 2 eq. 3 ; (14) : 2 eq. 16 + 2 eq. 18 + 2 eq. 19 + 6b + 2 eq. 1m + 2 eq. 3m.

Ce gel d'électrophorèse montre que les assemblages sont obtenus. Cependant, quelques défauts sur le gel montrent que la méthode peut être améliorée. Deux paramètres sont à étudier : les conditions d'hybridations ne sont peut-être pas optimales pour de telles structures d'une part, d'autre part la migration sur le gel est peut-être trop rapide.

2.2.2. Température de dénaturation

Comme dans le cas des assemblages de type linéaire, des mesures de températures de dénaturation T_m ont été menées (Figure 20).

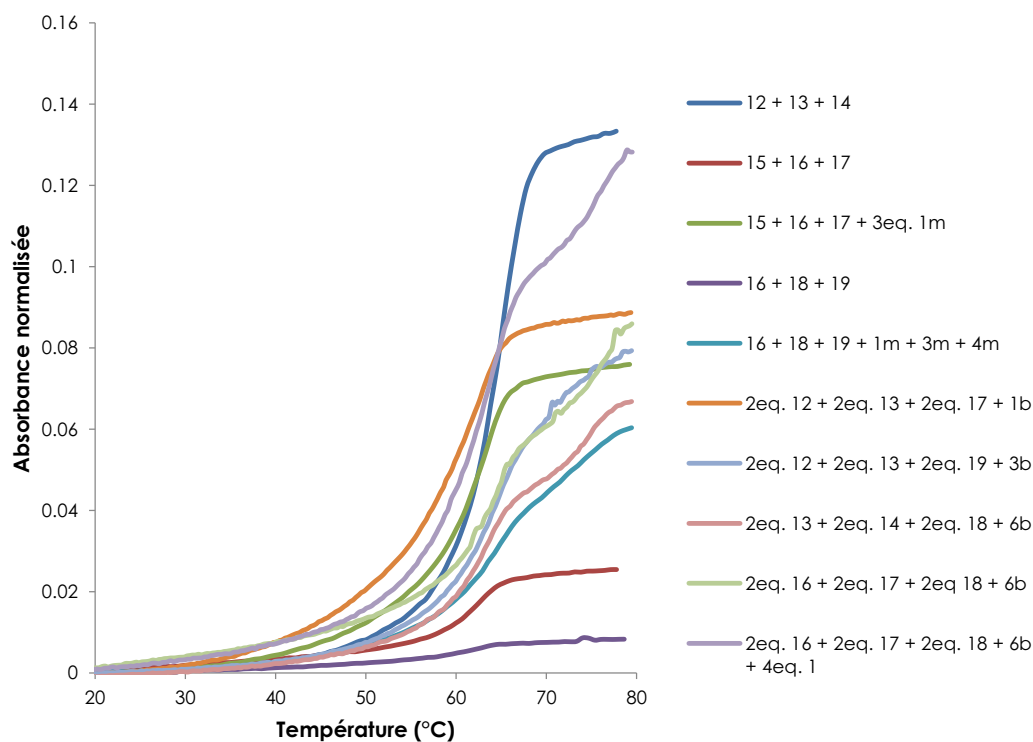


Figure 20 - Mesure des T_m des assemblages en étoiles.

Les résultats montrent des valeurs de T_m moyennes spécifiques des assemblages (Table 4). Cependant, même s'il reste aisé de trouver les valeurs de T_m des assemblages à une seule étoile, il est plus difficile d'extraire les valeurs dans le cas des assemblages à deux étoiles, d'autant plus que la taille de l'assemblage augmente. Par ailleurs, dès lors qu'il y a présence de ruthénium dans les assemblages, les ruptures de pente des courbes sont moins nettes et rendent plus difficile la lecture des T_m .

Assemblage	Nombre de complexes de ruthénium	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
12 + 13 + 14	0	67,1	N/A
15 + 16 + 17	0	61,9	N/A
16 + 18 + 19	0	62,2	N/A
15 + 16 + 17 + 3eq 1m	3	63,4	N/A
16 + 18 + 19	0	62,8	N/A
16 + 18 + 19 + 1m + 3m + 4m	3	65,5	74,8
2eq. 12 + 2eq. 13 + 2eq. 17 + 1b	1	63,3	N/A
2eq. 12 + 2eq. 13 + 2eq. 19 + 3b	1	64,9	-
2eq. 13 + 2eq. 14 + 2eq. 18 + 6b	1	64,0	75,0
2eq. 16 + 2eq. 17 + 2eq. 18 + 6b + 4eq.1	1	63,8	75,4

Table 4 – Valeurs de T_m mesurées des assemblages étoilés.

2.2.3. Dichroïsme circulaire

Des expériences de dichroïsme circulaire ont été effectuées de façon à voir la forme des différents duplex formés lors de l'hybridation des structures étoilées (Figure 21). Tous les assemblages montrent une forme similaire correspondant à la forme de duplex B de l'ADN comme c'était le cas pour les assemblages linéaires. La structuration de tels assemblages en présence de complexes de ruthénium ne change donc pas la conformation des duplex d'ADN formés.

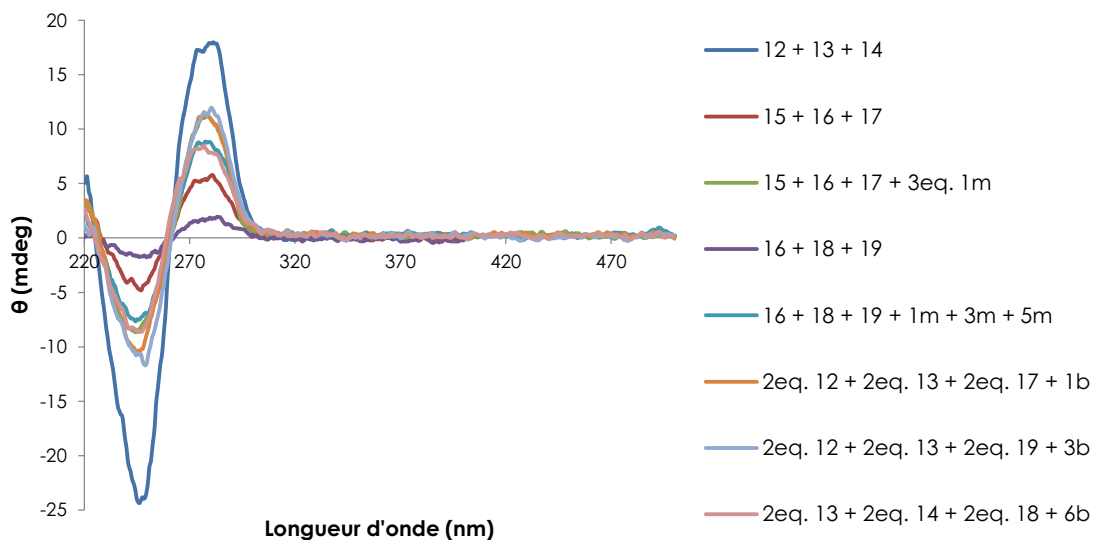


Figure 21 – Dichroïsme circulaire des assemblages de formes étoilées

2.2.4. Spectrophotométrie de luminescence

Des spectres d'émission de luminescence ont été enregistrés avec une longueur d'onde d'excitation à 458 nm. Le comportement des complexes de ruthénium ne change pas, avec des émissions comprises entre les émissions du complexe de ruthénium lié à un ODN (664 nm) et celui lié à deux ODNs (674 nm).

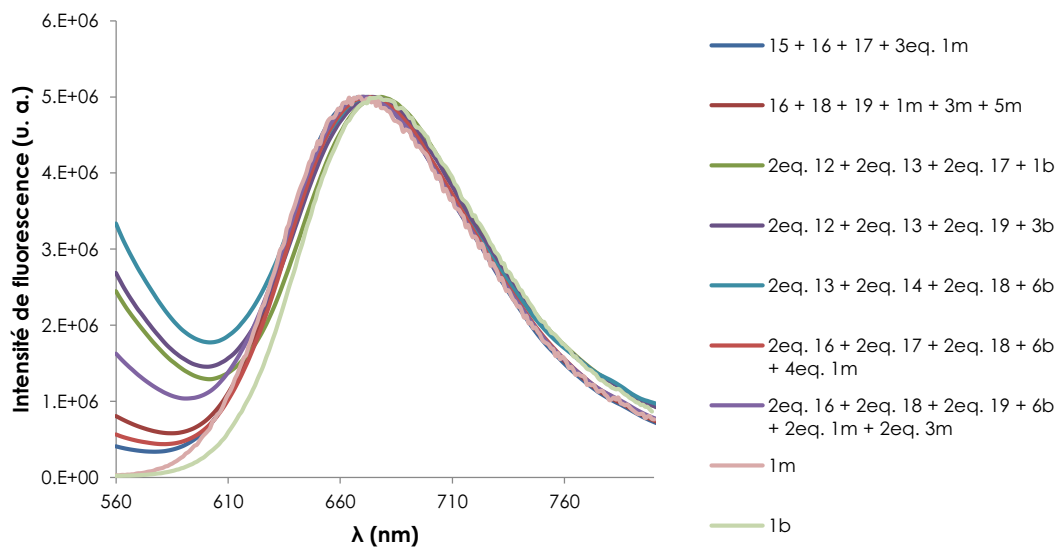


Figure 22 – Spectres de luminescence des assemblages de formes étoilées.

2.3. Conclusion sur les assemblages de forme étoile

La structure permettant de former ces assemblages est une étoile à trois branches formée de trois duplex hybridés deux à deux. Des *sticky ends* positionnés aux extrémités des branches de l'étoile ont permis par hybridation de lier un complexe de ruthénium sur chaque branche à l'aide des molécules hybrides mono-ruthénium **Xm**. En utilisant les molécules hybrides ruthénium bis-ODN **Xb**, deux étoiles ont pu être liées entre elles pour former des structures en double-étoile comportant ou non des complexes de ruthénium aux extrémités des branches.

3. Conclusions

Les molécules **Xm** et **Xb** obtenues ont permis de former des assemblages spécifiques et précis par la propriété d'hybridation des séquences nucléotidiques complémentaires. Deux types d'assemblages ont été obtenus : des assemblages linéaires et des assemblages de forme étoilée.

Premièrement, des assemblages de type linéaires ont permis de positionner de un à sept complexes de ruthénium sur un duplex d'ADN. L'utilisation de complexes de ruthénium liés à deux longs oligonucléotides (**7b** et **8b**) a permis d'hybrider sur ces longs brins d'autres oligonucléotides plus courts liés à un complexe de ruthénium et ainsi de les positionner à façon. Les séquences nucléotidiques employées définissent la spécificité des assemblages : leurs longueurs et leurs séquences sont les clés du positionnement des complexes métalliques le long de la structure.

Deuxièmement, des structures de forme étoilée ont été obtenues. Une structure d'étoile à trois branches formée de trois ODNs associée aux *sticky ends* a permis de positionner précisément des complexes de ruthénium en périphérie des étoiles. Des structures formées de deux étoiles liées par les molécules **1b**, **3b** et **5b** ont été obtenues et des complexes de ruthénium ont été placés sur leurs périphéries. Cette structure est modulaire puisque des complexes de ruthénium sont positionnables au centre des structures comme sur leurs périphéries. La séquence des *sticky ends* définit la position de chaque complexe de ruthénium.

Chapitre 3

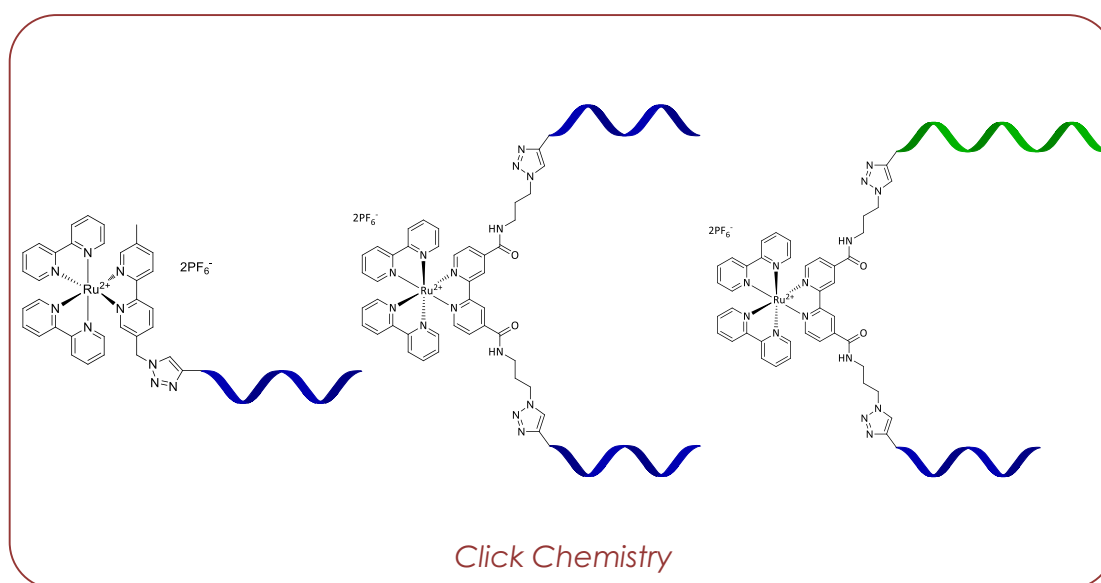
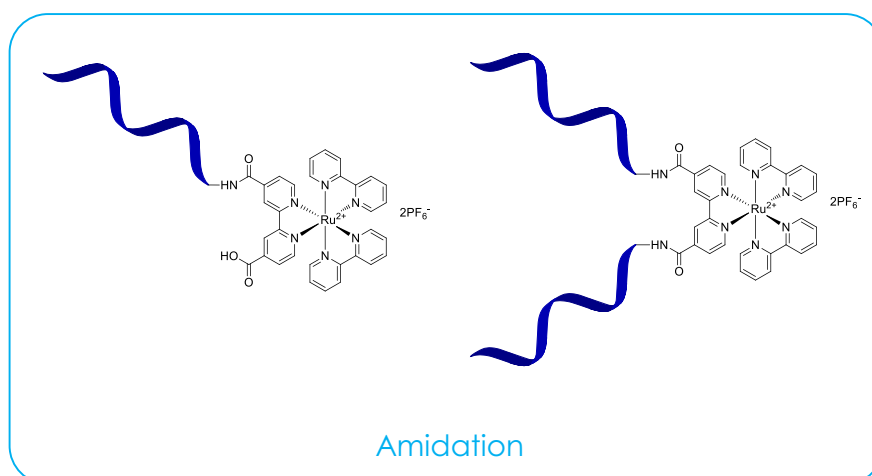
(1) Zhou, T.; Chen, P.; Niu, L.; Jin, J.; Liang, D.; Li, Z.; Yang, Z.; Liu, D. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 11271.

(2) Duprey, J.-L. H. A.; Takezawa, Y.; Shionoya, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *52*, 1212.

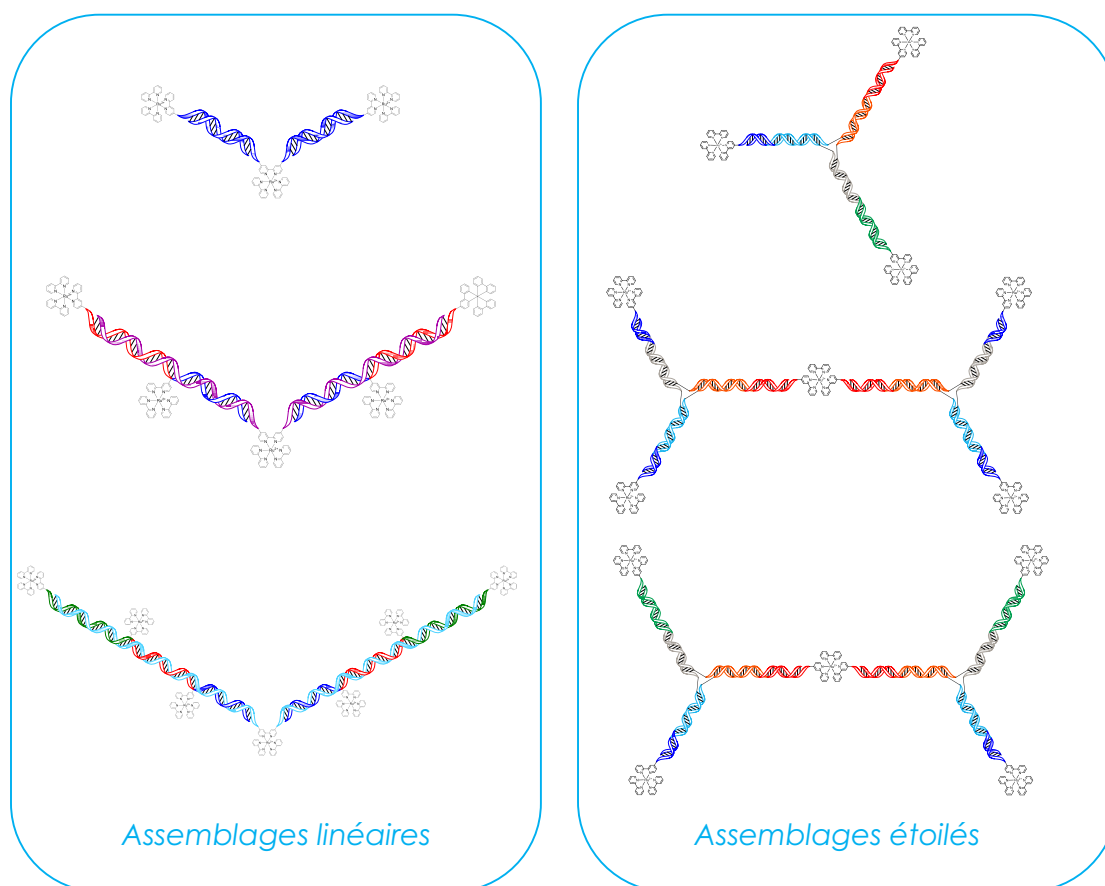
Conclusion générale

Conclusion générale

Le but de ce travail consistait à obtenir des structures moléculaires hybrides composées d'oligonucléotides et de complexes de ruthénium. La disponibilité commerciale d'oligonucléotides modifiés en position 5' par des amines et par des alcynes, ainsi que le développement de la synthèse de complexes de ruthénium modifiés par des acides carboxyliques et des azotures, ont permis de former des molécules hybrides par le biais de deux réactions distinctes. La réaction d'amidation et celle de *click chemistry* ont permis de lier un complexe de ruthénium avec un oligonucléotide, deux oligonucléotides identiques et enfin deux oligonucléotides différents.



Les différentes molécules hybrides obtenues ont été assemblées entre elle grâce à l'hybridation de l'ADN. D'une part, des structures dites « linéaires » ont été assemblées. Ces molécules sont constituées de plusieurs complexes de ruthénium (1 à 7) positionnés de manière précise entre des duplex d'ADN. D'autre part, des structures en forme d'étoile à trois branches ont été assemblées. Ces structures sont obtenues avec des séquences nucléiques incorporant une chaîne organique à douze carbones dans la séquence. L'utilisation de *sticky ends* en bout des bras de l'étoile a permis de positionner des complexes de ruthénium sur sa périphérie, mais également de doubler la taille de la structure, puisque les complexes de ruthénium liés à deux brins nucléiques identiques permettent de lier entre elles deux étoiles.



Il est évident que ce manuscrit ne regroupe pas tous les assemblages nucléiques qu'il est possible d'atteindre. Avec les complexes de ruthénium liés à deux brins différents obtenus par *click chemistry*, les méthodologies d'assemblages prennent une toute autre ampleur. En effet, deux brins différents permettent une spécificité accrue de la structure et ainsi de lier deux oligonucléotides distincts, chacun pouvant être lié à un brin distinct par l'intermédiaire du complexe de ruthénium.

Une autre avancée à atteindre dans la suite de ces travaux est la synthèse de complexes de ruthénium liés à plus de deux oligonucléotides. Récemment, des travaux ont montré la possibilité d'obtenir des complexes de ruthénium fonctionnalisés par six azotures directement sur les bipyridines.¹ La géométrie octaédrique du complexe de ruthénium permet d'imaginer des structures dans les trois dimensions de l'espace, pouvant être assemblées avec les molécules hybrides Complexe de ruthénium/ADN décrites dans ce manuscrit.

(1) Chitre, K. P.; Guillén, E.; Yoon, A. S.; Galoppini, E. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012, 5461-5464.

Partie expérimentale

Partie expérimentale

1. Matériels et appareillages

Tous les produits et solvants utilisés lors de ces travaux ont été achetés chez Sigma-Aldrich, Acros Organics, Alfa Aesar, Rectapur et Prolabo.

Les oligonucléotides fonctionnalisés en 5'- par des aminohexyles terminaux protégés ont été commandés chez Eurogentec France. Les oligonucléotides fonctionnalisés par des hexynes ont été commandés chez Integrated DNA Technologies (IDT).

Les purifications par chromatographie flash ont été faites sur un appareil Interchim Puriflash 430. Les purifications en HPLC préparatives ont été effectuées sur un appareil 'Autopurif' de Waters avec un détecteur à barrette de diodes. Pour la purification des complexes de ruthénium, une colonne Waters XBridge C18 5 μ m 150x19 mm a été utilisée. Une colonne Waters OST C18 2,5 μ m 10x50 mm a été utilisée pour la purification des oligonucléotides. Les contrôles de purification ont été effectués sur un appareillage UPLC Waters Acquity équipé d'un détecteur à barrette de diodes. Une colonne Waters Acquity XBridge C18 1,7 μ m 2,1x50 mm a été utilisée pour l'analyse des complexes de ruthénium et une colonne Waters Acquity OST C18 1,7 μ m 2,1x50 mm pour l'analyse des oligonucléotides.

Les tubes filtrant à centrifuger utilisés pour la purification des billes d'ODNs sont des Costar Spin-X HPLC *microcentrifuge filters* 0,2 μ m avec des membranes en nylon de la société Corning que l'on abrègera par Spin-X. Les dialyses de purification des réactions en solution dans le cadre des réactions de *click chemistry* ont été faites sur des tubes à centrifuger Amicon Ultra de chez Millipore de 0,5 et 4 mL possédant une membrane en cellulose régénérée avec un *cut-off* de 3000 g.mol⁻¹.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du ¹H et du ¹³C ont été acquis sur un spectromètre de chez Bruker, le 'Avance 300 MHz' avec une sonde BBFO ATMA. Les solvants deutérés suivants ont été utilisés :

- CD₃CN : ¹H-RMN référence δ = 1,96 ppm ; ¹³C-RMN référence δ = 118,26 ppm (CN) et 1,79 ppm (CH₃).
- CD₃OD : ¹H-RMN référence δ = 3,34 ppm ; ¹³C-RMN référence δ = 49,86 ppm
- CDCl₃ : ¹H-RMN référence δ = 7,26 ppm ; ¹³C-RMN référence δ = 77,36 ppm

- $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$: ^1H -RMN référence $\delta = 2,09$ ppm ; ^{13}C -RMN référence $\delta = 30,60$ ppm

Les analyses de spectrométrie de masse ont été effectuées en ESI-MS sur un appareillage AB Sciex API 365 équipé d'un triple quad en mode positif. Les analyses de spectrométrie de masse des oligonucléotides ont été faites sur un appareil de masse haute résolution (HRMS) Waters Qtof Ultima API en mode négatif.

Les analyses d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ont été effectuées sur un appareillage Hofer SE410-15-1.5. Les gels ont été visualisés grâce à une table d'illumination Invitrogen *Safe Imager 2.0 blue transilluminator* et sous lumière UV à $\lambda = 254$ nm et $\lambda = 365$ nm.

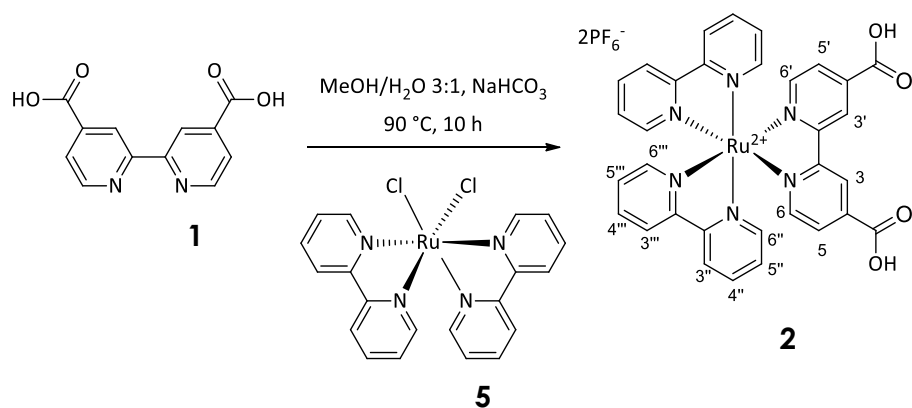
Les analyses de spectrophotométrie UV-Vis ont été effectuées sur un spectrophotomètre à barette de diodes Hewlett-Packard 8452A. Les mesures de températures de demi-association T_m ont été faites sur un appareillage Varian Cary 100 bio.

Les mesures de spectrophotométrie de fluorescence ont été effectuées sur un appareillage multi-composants de chez *Photon Technology International*.

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été effectuées sur un appareil Jasco J-815.

2. Synthèses des complexes de ruthénium

2.1. Synthèse du complexe de ruthénium $[\text{Ru}(4,4'\text{-biscarboxy-2,2'\text{-bipyridine)}_2(2,2'\text{-bipyridine})_2]^{2+}(\text{PF}_6^-)_2$ (**2**)¹

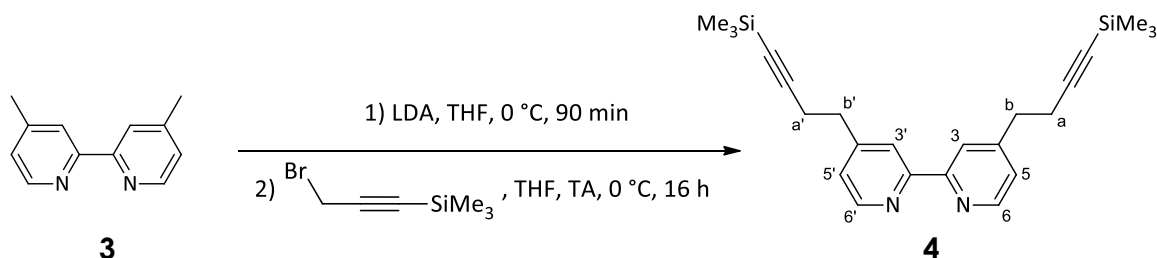


La (4,4'-biscarboxy)-2,2'-bipyridine **1** (1 g ; $4,09 \cdot 10^{-3}$ mol ; 1 eq.), le complexe de ruthénium (II) $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipyridine})_2]\text{Cl}_2$ **5** (2,7 g ; $5,27 \cdot 10^{-3}$ mol ; 1,3 eq.) et NaHCO₃

(1,2 g ; $1,4 \cdot 10^{-3}$ mol) sont dissous dans 12 mL de MeOH et 4 mL de H₂O et mis sous agitation à 90°C pendant 10 h. La solution est ensuite placée 1 h à -20°C puis un peu d'eau est ajoutée. Le pH est ajusté à 4 avec de l'acide sulfurique à 2 mol.L⁻¹, le précipité obtenu est filtré sur fritté et lavé avec du MeOH. Le filtrat est traité avec une solution aqueuse saturée de KPF₆ à froid et placé au congélateur pendant une nuit. Le précipité est filtré et purifié par chromatographie sur une colonne d'alumine neutre et éluée d'abord avec un mélange CH₃CN/H₂O/solution aqueuse de KNO₃ saturé 100/40/2 puis avec un mélange CH₃CN/H₂O 100/60 acidifié avec quelques gouttes de H₂SO₄. Les fractions contenant le produit sont concentrées et redissoutes dans un minimum d'acétone. Le produit est précipité par ajout d'une solution aqueuse saturée de KPF₆. Le précipité orange obtenu est filtré et lavé avec un minimum de H₂O. Rendement : 48 %.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃CN, δ ppm) : 7,44 (4H, m, H_{5''}, 5''') ; 7,73 (4H, dd, H_{6''}, 6''') ; 7,87 (2H, dd, H₅, 5') ; 7,95 (2H, d, H₆, 6') ; 8,12 (4H, m, H_{4''}, 4''') ; 8,55 (4H, d, H_{3''}, 3''') ; 9,18 (2H, s, H₃, 3').

2.2. Synthèse de la 4,4'-bis(4-(triméthylsilyl)but-3-yn-1-yl)-2,2'-bipyridine (**4**)²

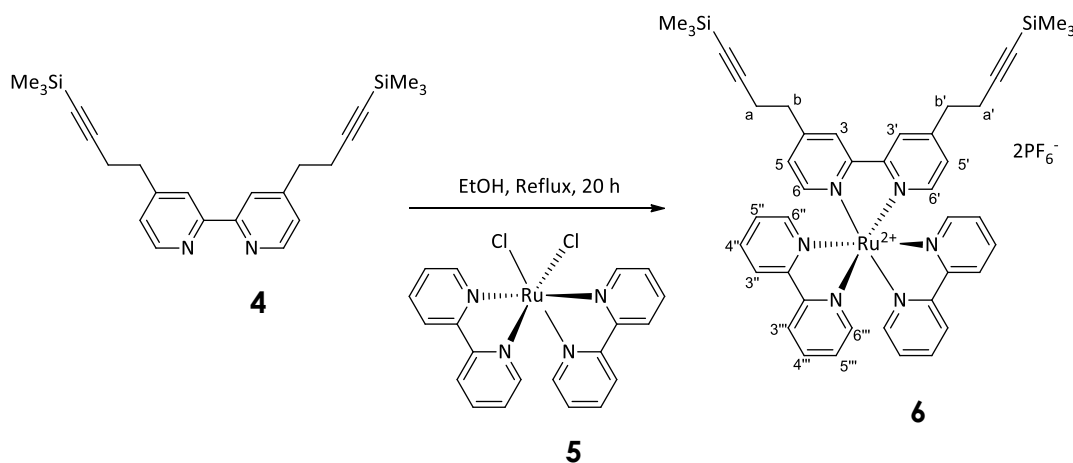


La 4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine **3** (1 g ; $5,43 \cdot 10^{-3}$ mol) est introduite dans un tricol de 100 mL surmonté d'une ampoule à brome, diluée dans 20 mL de THF puis refroidie à 0 °C à l'aide d'un bain de glace. Le diisopropylamidure de lithium (LDA) (7,2 mL ; $13,03 \cdot 10^{-3}$ mol ; 2,4 eq.) est ajouté en goutte à goutte sur 5 minutes. Le mélange est laissé sous agitation sous argon pendant 90 minutes à 0°C. Le 3-bromo-1-triméthylsilylprop-1-yne (2 mL ; $14,12 \cdot 10^{-3}$ mol ; 2,6 eq.) est dilué dans 5 mL de THF dans un tube de schlenck surmonté d'une ampoule à brome et porté à 0°C. Le mélange LDA/bipyridine est prélevé à la seringue et ajouté dans l'ampoule à brome, puis versé en goutte à goutte pendant 15 minutes sur la solution de 3-bromo-1-triméthylsilyl-1-propyne à 0°C. Le mélange est ensuite laissé sous agitation à température ambiante pendant 16h. Le produit est extrait à l'éther diéthylique (Et₂O) et lavé avec H₂O (3x20 mL). La phase organique est séchée avec Na₂SO₄,

filtrée et évaporée sous vide. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice désactivée avec un mélange 10% de triéthylamine (Et₃N) dans l'éther de pétrole (PE), puis éluée avec 5% d'acétate d'éthyle dans l'éther de pétrole. Le produit est un solide blanc cassé et il est obtenu avec un rendement de 51%.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 0,10 (18H, s, CH₃ TMS) ; 2,57 (4H, t, CH₂_{a,α'}) ; 2,90 (4H, t, CH₂_{b,β'}) ; 7,18 (2H, d, H_{5,5'}) ; 8,27 (2H, s, H_{3,3'}) ; 8,56 (2H, d, H_{6,6'}).

2.3. Synthèse du complexe [Ru(4,4'-bis(4-(trimethylsilyl)but-3-yn-1-yl)-2,2'-bipyridine)(2,2'-bipyridine)₂]²⁺(PF₆⁻)₂ (**6**)



Le bis(2,2'-bipyridine)bischlororuthénium (II) **5** (92 mg ; 1,90.10⁻⁴ mol ; 1 eq.) et la 4,4'-bis(4-(trimethylsilyl)but-3-ynyl)-2,2'-bipyridine **4** (100 mg ; 2,47.10⁻⁴ mol ; 1,3 eq.) sont dissous dans 7,5 mL d'EtOH et mis à reflux pendant 20h. Le solvant est évaporé sous vide et le solide obtenu est redissous dans un minimum d'acétone. Le complexe est précipité par l'ajout d'une solution aqueuse de KPF₆ saturée, filtré, lavé avec de l'Et₂O, redissous à l'aide de CH₃CN et enfin séché sous vide. Le produit est enfin purifié par HPLC en phase inverse sur colonne de silice greffée C₁₈ préparative (19x150 mm). Gradient :

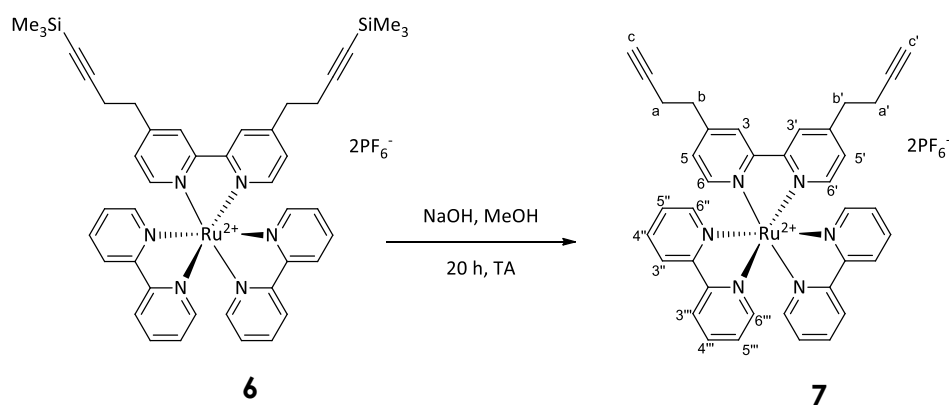
Temps (min)	% H ₂ O/TFA 0,1 %	% CN ₃ CN/TFA 0,1 %	Flux (mL/min)
0	25	75	17
8	15	85	17
9	15	85	17
10	5	95	17
12	5	95	17
12,5	25	75	17

Le complexe est redissous dans un minimum d'acétone et précipité à l'aide d'une solution aqueuse saturée de KPF_6 . Le produit est une poudre orange métallique ; rendement 94% ; Rf = 0,5 sur silice, éluant CH_3CN/H_2O /solution aqueuse de KNO_3 saturée 100/10/1.

ESI/MS : $m/z = 963,3$ correspondant à $(M-PF_6)^+$.

1H -RMN (300 MHz, CD_3CN , δ ppm) : -0,02 (18H, s, CH_3 TMS) ; 2,62 (4H, t, $CH_{2\alpha,\alpha'}$) ; 2,99 (4H, t, $CH_{2\beta,\beta'}$) ; 7,30 (2H, dd, $CH_{5,5'}$) ; 7,40 (4H, tt, $CH_{5'',5''''}$) ; 7,60 (2H, d, $CH_{6,6'}$) ; 7,71 (4H, td, $CH_{6'',6''''}$) ; 8,05 (4H, td, $CH_{4'',4''''}$) ; 8,40 (2H, d, $CH_{3,3'}$) ; 8,49 (4H, d, $CH_{3'',3''''}$).

2.4. Synthèse du complexe $[Ru(4,4'$ -bis(but-3-yn-1-yl)-2,2'-bipyridine)(2,2'-bipyridine) $]$ $^{2+}(PF_6^-)_2$ (7)



Le complexe de ruthenium $[Ru(4,4'$ -bis(4-(trimethylsilyl)but-3-yn-1-yl)-2,2'-bipyridine)(2,2'-bipyridine) $]$ $^{2+}(PF_6^-)_2$ **6** (197 mg ; $1,78 \cdot 10^{-4}$ mol ; 1 eq.) est dissous dans 10 mL de méthanol en présence de NaOH (200 mg ; 5 mmol ; 28 eq.) et laissé sous agitation pendant 20 h à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé sous vide, redissous dans un minimum d'acétone et précipité par ajout d'une solution aqueuse saturée de KPF_6 . Le solide orange métallique est filtré, lavé avec H_2O et récupéré par redissolution dans CH_3CN . Le produit est enfin purifié par HPLC en phase inverse sur colonne de silice greffée C_{18} préparative (19x150 mm).

Gradient :

Temps (min)	% H ₂ O/TFA 0,1 %	% CN ₃ CN/TFA 0,1 %	Flux (mL/min)
0	25	75	17
8	15	85	17
9	15	85	17
10	5	95	17
12	5	95	17
12,5	25	75	17

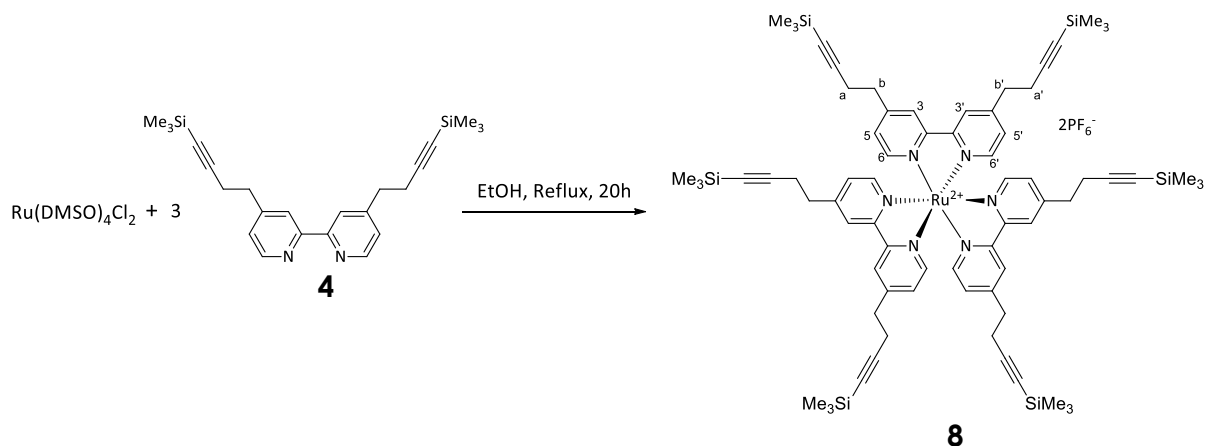
Le complexe est dissous dans un minimum d'acétone et précipité par ajout d'une solution aqueuse saturée de KPF₆. Une poudre orange métallique est obtenue avec un rendement de 75%.

ESI/MS : m/z = 819,1 correspondant à (M-PF₆)⁺.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃CN, δ ppm) : 2,22 (2H, t, CH_{c,c'}) ; 2,62 (4H, td, CH_{2 a,a'}) ; 3,02 (4H, t, CH_{2 b,b'}) ; 7,32 (2H, dd, CH_{5,5'}) ; 7,41 (4H, q, CH_{5'',5'''}) ; 7,62 (2H, d, CH_{6,6'}) ; 7,74 (4H, t, CH_{6'',6'''}) ; 8,06 (4H, t, CH_{4'',4'''}) ; 8,42 (2H, d, CH_{3,3'}) ; 8,51 (4H, d, CH_{3'',3'''}).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃CN, δ ppm) : 19,3 (CH_{2 a,a'}) ; 34,3 (CH_{2 b,b'}) ; 71,2 (C quaternaires alcyne) ; 82,0 (CH_{c,c'}) ; 125,2 (C_{3,3',3'',3'''}) ; 128,5 (C_{5,5',5'',5'''}) ; 138,6 (C_{4,4',4'',4'''}) ; 152,6 (C_{6,6',6'',6'''}) ; 157,9 (C_{2,2',2'',2'''}).

2.5. Synthèse du complexe $[Ru(4,4'-bis(4-(triméthylsilyl)but-3-yn-1-yl)-2,2'-bipyridine)_3]^{2+}(PF_6^-)_2$ (**8**)



La 4,4'-bis(4-(triméthylsilyl)but-3-ynyl)-2,2'-bipyridine **4** (100 mg ; $2,47 \cdot 10^{-4}$ mol ; 3,9 eq.) et le dichlorotetrakis(diméthylsulfoxyde)ruthénium(II) ($Ru(DMSO)_4Cl_2$) (30,7 mg ; $6,34 \cdot 10^{-5}$ mol ; 1 eq.) sont dissous dans 7,5 mL d'EtOH. Le mélange est ensuite agité à reflux pendant 20 h sous argon. La solution résultante est évaporée sous vide. Le complexe de ruthénium est dissous dans un minimum d'acétone et précipité par ajout d'une solution aqueuse saturée de KPF_6 . Le précipité est filtré et purifié par HPLC sur colonne de silice préparative greffée C_{18} (19x150 mm). Gradient :

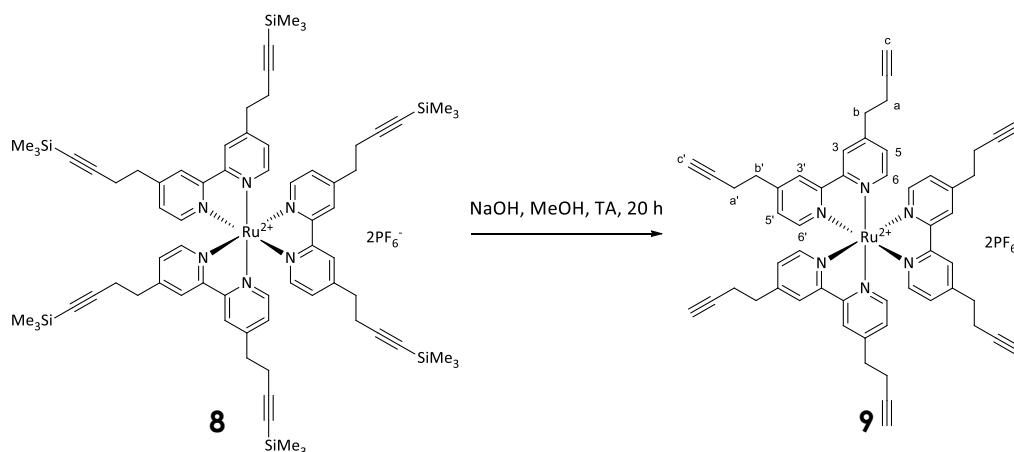
Temps (min)	% H_2O/TFA 0,1 %	% CN_3CN/TFA 0,1 %	Flux (mL/min)
0	25	75	17
8	15	85	17
9	15	85	17
10	5	95	17
12	5	95	17
12,5	25	75	17

Les fractions sont évaporées et le complexe est dissous dans un minimum d'acétone, puis précipité par ajout d'une solution aqueuse de KPF_6 saturée. Le produit est une poudre orange métallique obtenue avec un rendement de 75%.

ESI/MS : $m/z = 1459,5$ correspondant à $(M-PF_6)^+$.

1H -RMN (300 MHz, CD_3CN , δ ppm) : 0,01 (54H, s, CH_3 TMS) ; 2,62 (12H, t, CH_2 α , α') ; 2,96 (12H, t, CH_2 β , β') ; 7,29 (6H, d, $H_{5,5'}$) ; 7,55 (6H, d, $H_{6,6'}$) ; 8,40 (6H, s, $H_{3,3'}$).

2.6. Synthèse du complexe $[Ru(4,4'-bis(4-but-3-ynyl)-2,2'-bipyridine)_3]^{2+}(PF_6^-)_2$ (**9**)



144 mg de $[Ru(4,4'-bis(4-(triméthylsilyl)but-3-yn-1-yl)-2,2'-bipyridine)_3]^{2+}(PF_6^-)_2$ (**8**) ($8,9 \cdot 10^{-5}$ mol) sont dissous dans 5 mL de MeOH. 64 mg de NaOH ($1,6 \cdot 10^{-3}$ mol ; 18 eq.) sont ajoutés et la solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant 20 h. Le solvant est évaporé sous vide, puis le brut réactionnel est dissous dans un minimum d'acétone, précipité par ajout d'une solution aqueuse de KPF₆ saturée puis lavé abondamment avec de l'acétate d'éthyle. Le produit est ensuite purifié par HPLC sur colonne de silice greffée C₁₈ préparative (19x150 mm). Gradient :

Temps (min)	% H ₂ O/TFA 0,1 %	% CN ₃ CN/TFA 0,1 %	Flux (mL/min)
0	25	75	17
8	15	85	17
9	15	85	17
10	5	95	17
12	5	95	17
12,5	25	75	17

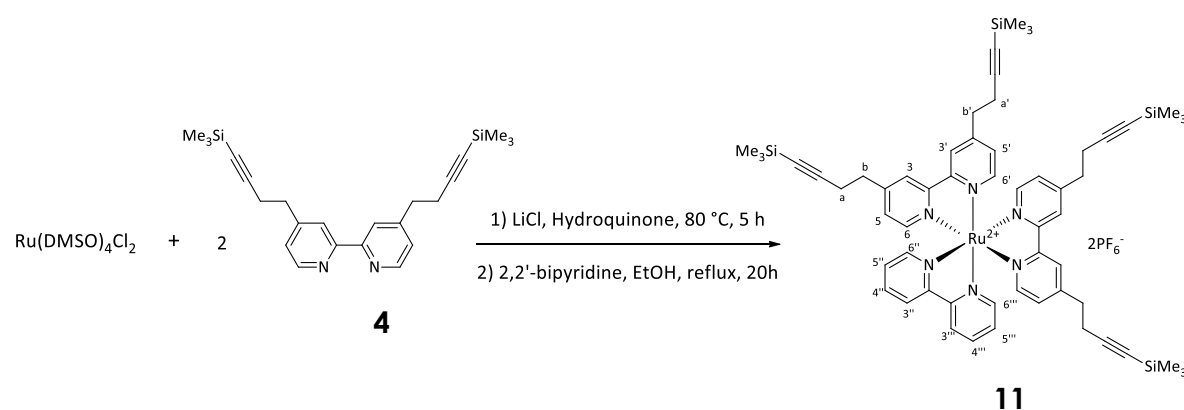
Le produit est dissous dans un minimum d'acétone et précipité avec une solution saturée de KPF₆. Une poudre orange métallique est obtenue avec un rendement de 95 %.

ESI/MS : m/z = 1027,3 correspondant à (M-PF₆)⁺.

^1H -RMN (300 MHz, CD_3CN , δ ppm) : 2,23 (6H, t, $\text{CH}_{\text{C},\text{C}'}$) ; 2,61 (12H, td, $\text{CH}_2_{\text{a},\text{a}'}$) ; 3,01 (12H, t, $\text{CH}_2_{\text{b},\text{b}'}$) ; 7,31 (6H, dd, $\text{H}_{5,5'}$) ; 7,56 (6H, d, $\text{H}_{6,6'}$) ; 8,40 (6H, s, $\text{H}_{3,3'}$).

^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3CN , δ ppm) : 18,8 ($\text{CH}_2_{\text{a},\text{a}'}$) ; 33,8 ($\text{CH}_2_{\text{b},\text{b}'}$) ; 70,7 (C quaternaires alcyne) ; 82,9 ($\text{CH}_{\text{C},\text{C}'}$) ; 124,7 ($\text{C}_{3,3'}$) ; 128,0 ($\text{C}_{5,5'}$) ; 152,6 ($\text{C}_{6,6'}$) ; 152,5 ($\text{C}_{4,4'}$) ; 157,2 ($\text{C}_{2,2'}$).

2.7. Synthèse du complexe $[\text{Ru}(4,4'\text{-bis}(4\text{-(triméthylsilyl)but-3-ynyl)-2,2'\text{-bipyridine})_2(2,2'\text{-bipyridine})]^{2+}(\text{PF}_6^-)_2$ (**11**)



59,8 mg ($1,24 \cdot 10^{-4}$ mol) de $\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2$, 100 mg ($47 \cdot 10^{-4}$ mol ; 2 eq.) de 4,4'-bis(4-(triméthylsilyl)but-3-ynyl)-2,2'-bipyridine **4**, 34 mg ($3,09 \cdot 10^{-4}$ mol ; 2,5 eq.) d'hydroquinone et 157,1 mg ($37,05 \cdot 10^{-4}$ mol ; 3 eq.) de LiCl sont dissous dans 5 mL d'un mélange 1/3 DME (diméthoxyéthane) 2/3 MeOH préalablement dégazé. La solution jaune clair obtenue est chauffée sous argon à 80 °C pendant 5 h. Le produit est extrait avec un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$. La phase organique est évaporée et le brut réactionnel obtenu est utilisé tel quel dans l'étape suivante.

Le brut réactionnel est redissous dans 10 mL d'EtOH et 35 mg de 2,2'-bipyridine ($2,24 \cdot 10^{-4}$ mol ; 1,8 eq. théoriques) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est porté à reflux sur 20 h. Après évaporation du solvant, le produit est précipité avec un mélange acétone/ Et_2O et lavé abondamment avec Et_2O et de l'éther de pétrole. Le complexe est ensuite redissous dans un minimum d'acétone et précipité avec une solution aqueuse saturée de KPF_6 . Le précipité est filtré et purifié par HPLC sur colonne de silice greffée C_{18} préparative (19x150 mm).

Gradient :

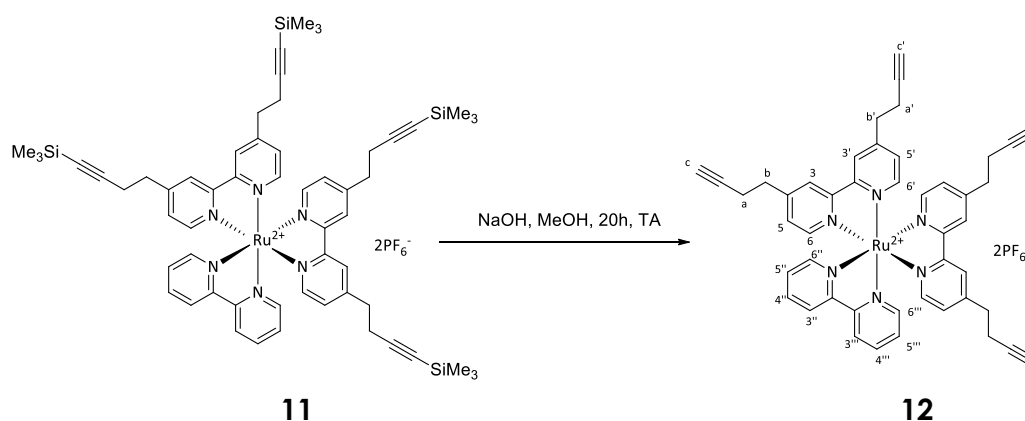
Temps (min)	% H ₂ O/TFA 0,1 %	% CN ₃ CN/TFA 0,1 %	Flux (mL/min)
0	25	75	17
8	15	85	17
9	15	85	17
10	5	95	17
12	5	95	17
12,5	25	75	17

Le produit purifié est dissous dans un minimum d'acétone et précipité avec une solution aqueuse saturée de KPF₆. Une poudre orange métallique est obtenue avec un rendement de 37 %.

ESI/MS : m/z = 1211,3 correspondant à (M-PF₆)⁺.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃CN, δ ppm) : -0,02 (36H, s, CH₃ TMS) ; 2,61 (8H, t, CH₂_{a,a'}) ; 2,96 (8H, t, CH₂_{b,b'}) ; 7,29 (4H, dd, H_{5,5'}) ; 7,39 (2H, td, H_{5'',5'''}) ; 7,58 (4H, dd, H_{6,6'}) ; 7,67 (2H, d, H_{6'',6'''}) ; 8,04 (2H, t, H_{4'',4'''}) ; 8,40 (4H, s, H_{3,3'}) ; 8,49 (2H, d, H_{3'',3'''}).

2.8. Synthèse du complexe [Ru(4,4'-bis(4-but-3-yn-1-yl)-2,2'-bipyridine)₂(2,2'-bipyridine)]²⁺(PF₆⁻)₂ (**12**)



29,6 mg ($2,18 \cdot 10^{-5}$ mol) de [Ru(4,4'-bis(4-(trimethylsilyl)but-3-ynyl)-2,2'-bipyridine)₂(2,2'-bipyridine)]²⁺(PF₆⁻)₂ **11** et 95,2 mg ($2,38 \cdot 10^{-3}$ mol ; 100 eq.) de NaOH sont dissous dans 5 mL de MeOH. La solution est agitée pendant 20 h à température ambiante puis le solvant est évaporé sous vide. Le complexe obtenu est dissous

dans un minimum d'acétone et précipité par ajout d'une solution aqueuse saturée de KPF₆. Le précipité est filtré et purifié par HPLC sur colonne de silice greffée C₁₈ préparative (19x150 mm) ; t_r = 8 min. Gradient :

Temps (min)	% H ₂ O/TFA 0,1 %	% CN ₃ CN/TFA 0,1 %	Flux (mL/min)
0	25	75	17
8	15	85	17
9	15	85	17
10	5	95	17
12	5	95	17
12,5	25	75	17

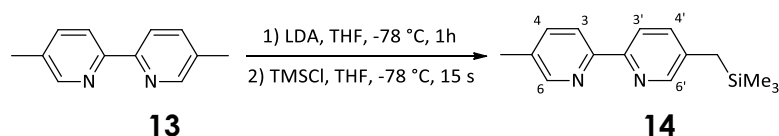
Le produit purifié est dissous dans un minimum d'acétone et précipité par ajout d'une solution aqueuse saturée de KPF₆. Le produit est une poudre orange métallique obtenue avec un rendement de 75%.

ESI/MS : m/z = 923,2 correspondant à (M-PF₆)⁺.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃CN, δ ppm) : 2,22 (4H, quadruplet, CH_{c,c'}) ; 2,61 (8H, tt, CH_{2,α'}) ; 3,01 (8H, td, CH_{2,β'}) ; 7,29 (4H, td, H_{5,5'}) ; 7,30 (2H, td, H_{5'',5'''}) ; 7,58 (4H, t, H_{6,6'}) ; 7,68 (2H, d, H_{6'',6'''}) ; 8,04 (2H, td, H_{4'',4'''}) ; 8,40 (4H, s, H_{3,3'}) ; 8,48 (2H, d, H_{3'',3'''}).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃CN, δ) : 18,4 (CH_{2,α,α'}) ; 33,4 (CH_{2,β,β'}) ; 70,3 (C quaternaires alcyne) ; 82,5 (CH_{c,c'}) ; 124,2 (C_{3'',3'''}) ; 124,4 (C_{3,3'}) ; 127,5 (C_{5'',5'''}) ; 127,6 (C_{5,5'}) ; 137,6 (C_{4'',4'''}) ; 150,9 (C_{6'',6'''}) ; 151,1 (C_{6,6'}) ; 152,2 (C_{4,4'}) ; 156,7 (C_{2'',2'''}) ; 157,1 (C_{2,2'}).

2.9. Synthèse de la 5-méthyl-5'-(triméthylsilyl)méthyl-2,2'-bipyridine (**14**)³

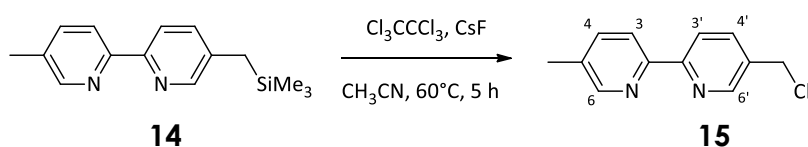


18 mL de THF anhydre et 1,3 mL (9,2.10⁻³ mol) de diisopropylamine sont mis à -78 °C sous argon. Du n-BuLi (5 mL, 8,2.10⁻³mol) est ajouté et la solution est maintenue à -78 °C pendant 10 min. Elle est ensuite mise à 0 °C pendant 10 min puis remise à -78 °C. 1 g (5,42 mol) de 5,5'-bisméthyl-2,2'-bipyridine **13** est dissous dans 15 mL de THF anhydre sous argon et la solution transférée à l'aide d'une canule

sur la solution de LDA. Le mélange est laissé sous agitation à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 1 h. Du chlorure de triméthylsilane (TMSCl) ($0,9\text{ mL}$; $6,52 \cdot 10^{-3}\text{ mol}$) est ajouté au mélange. Au bout de 15 s la réaction est stoppée par ajout de 5 mL d'EtOH. Après évaporation du THF, le produit est extrait avec du CH_2Cl_2 et une solution saturée de NaHCO_3 . La phase organique est lavée avec une solution de NaCl saturée ($3 \times 50\text{ mL}$), séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et concentrée pour obtenir une poudre blanc cassé avec un rendement de 90 %.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 0,02 (9H, s, CH_3 TMS) ; 2,11 (2H, s, CH_2) ; 2,37 (3H, s, CH_3) ; 7,43 (1H, dd, H_4) ; 7,59 (1H, dd, $\text{H}_{4'}$) ; 8,21 (2H, m, $\text{H}_{3,3'}$) ; 8,33 (1H, d, H_6) ; 8,47 (1H, d, $\text{H}_{6'}$).

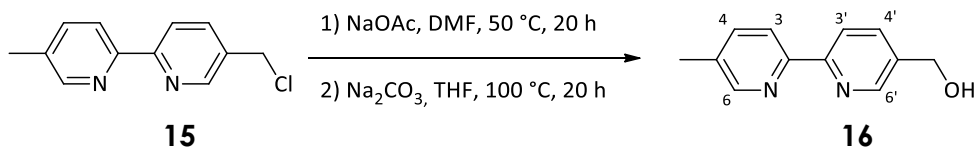
2.10. Synthèse de la 5-méthyl-5'-chlorométhyl-2,2'-bipyridine (15)⁴



1,338 g ($5,2 \cdot 10^{-3}\text{ mol}$) de 5-(triméthylsilyl)méthyl-5'-méthyl-2,2'-bipyridine **14**, 6,2 g ($2,61 \cdot 10^{-2}\text{ mol}$; 5 eq.) d'hexachloroéthane et 4 g ($2,61 \cdot 10^{-2}\text{ mol}$; 5 eq.) de fluorure de césium sont dissous dans 45 mL d'acétonitrile fraîchement distillé. La solution est chauffée à $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 5 h. Après réaction, le solvant est évaporé sous vide et le produit est extrait avec un mélange H_2O /acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec une solution de NaCl saturée, séchée sur Na_2SO_4 , filtrée puis évaporée sous vide. Le solide jaune obtenu est chromatographié sur une colonne de silice éluee avec un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole 5/95. Un gradient progressif par augmentation de la proportion d'acétate d'éthyle jusqu'à 20/80 permet de récupérer le produit dans un mélange qui est recristallisé à l'hexane à chaud. Le précipité est blanc jaune et le rendement de la réaction est de 65 %.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 2,40 (3H, s, CH_3) ; 4,64 (2H, s, CH_2) ; 7,62 (1H, dd, H_4) ; 7,83 (1H, dd, $\text{H}_{4'}$) ; 8,29 (1H, d, H_3) ; 8,38 (1H, d, $\text{H}_{3'}$) ; 8,51 (1H, d, H_6) ; 8,65 (1H, d, $\text{H}_{6'}$).

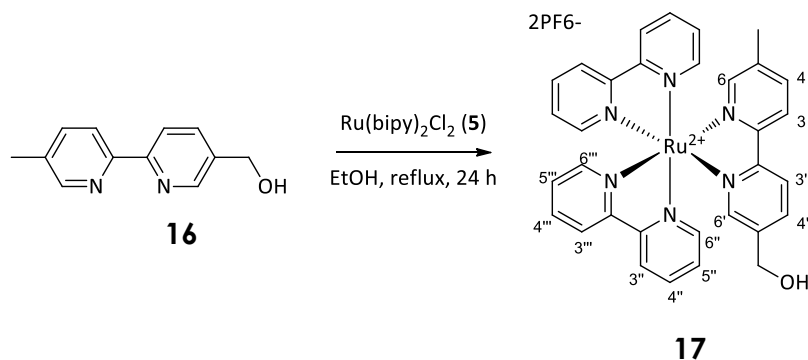
2.11. Synthèse de la 5-méthyl-5'-(hydroxy)méthyl-2,2'-bipyridine (**16**)⁵



740 mg ($3,38 \cdot 10^{-3}$ mol) de 5-méthyl-5'-chlorométhyl-2,2'-bipyridine **15** et 4,16 g ($5 \cdot 10^{-2}$ mol ; 15 eq.) d'acétate de sodium sont dissous dans 20 mL de DMF anhydre. La solution est chauffée à 50 °C sur 20 h, puis le DMF est évaporé. Le produit est extrait avec un mélange H₂O/CH₂Cl₂ et la phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et filtrée. Après évaporation du solvant, le produit est redissous dans 30 mL de THF. Une solution est préparée en dissolvant 1,5 g de Na₂CO₃ (0,13 mol) dans 30 mL H₂O et ajoutée au mélange réactionnel. La solution est mise à reflux pendant 20 h. Les solvants sont évaporés et le produit est extrait avec un mélange H₂O/acétate d'éthyle chaud. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous vide. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice avec un gradient de CH₂Cl₂/MeOH de 1 % à 5 %. Une poudre blanche est obtenue avec un rendement de 73 %.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 2,40 (3H, s, CH₃) ; 4,77 (2H, s, CH₂) ; 7,63 (1H, dd, H₄) ; 7,82 (1H, dd, H_{4'}) ; 8,26 (1H, dd, H₃) ; 8,33 (1H, dd, H_{3'}) ; 8,50 (1H, d, H₆) ; 8,62 (1H, d, H_{6'}).

2.12. Synthèse du complexe [Ru(5-méthyl-5'-(hydroxy)méthyl-2,2'-bipyridine)(bipyridine)](PF₆)₂ (17**)⁶**

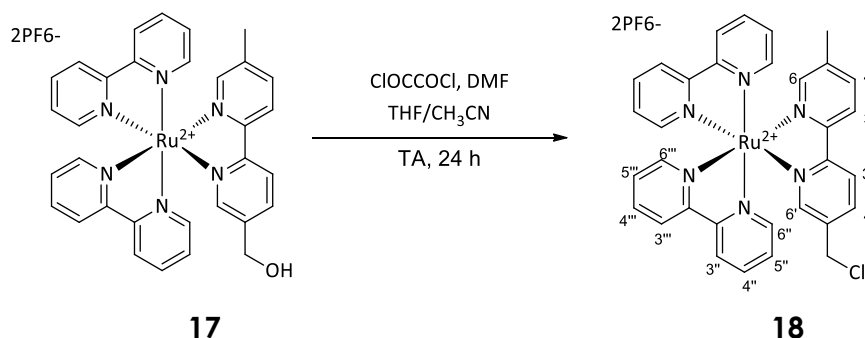


161 mg ($3,33 \cdot 10^{-4}$ mol) de bis(2,2'-bipyridine)bischlororuthénium (II) **5** et 161 mg du produit **16** ($4,99 \cdot 10^{-4}$ mol ; 1,5 eq.) sont dissous dans 5 mL d'éthanol. Le mélange est porté à reflux pendant 24 h puis les solvants sont évaporés. Le produit est extrait avec un mélange H₂O/acétate d'éthyle. La phase aqueuse est concentrée et du KPF₆ est ajouté pour faire précipiter le complexe. Le produit est filtré et lavé avec un minimum d'eau. Le produit est redissous dans l'eau chaude et reprécipité en refroidissant. Un solide orange est obtenu avec un rendement de 95 %.

ESI/MS : $m/z = 759,1$ correspondant à $(M-PF_6)^+$.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃CN, δ ppm) : 2,20 (3H, s, CH₃) ; 3,34 (1H, t, OH) ; 4,47 (2H, s, CH₂) ; 7,38 (4H, m, H_{5'',5'''}) ; 7,50 (1H, d, H₄) ; 7,58 (1H, d, H_{4'}) ; 7,72 (4H, t, H_{4'',4'''}) ; 7,86 (1H, dd, H₃) ; 7,95 (1H, dd, H_{3'}) ; 8,05 (4H, tm, H_{3'',3'''}) ; 8,37 (2H, dd, H_{6,6'}) ; 8,49 (4H, d, H_{6'',6'''}).

2.13. Synthèse du complexe [Ru(5-méthyl-5'-(hydroxy)méthyl-2,2'-bipyridine)(2,2'-bipyridine)₂](PF₆)₂ (18**)⁶**

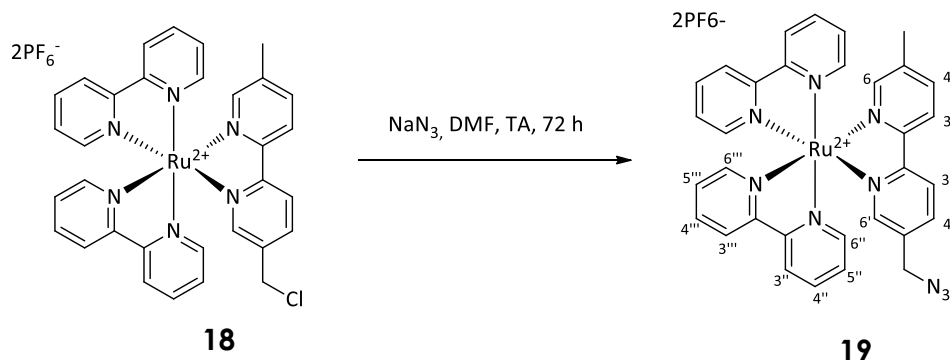


52 μL de chlorure d'oxalyle ($5,96 \cdot 10^{-4}$ mol ; 5 eq.) sont dissous dans 1 mL de THF, mis à 0 °C, puis 50 μL de DMF ($5,96 \cdot 10^{-4}$ mol ; 5 eq.) sont ajoutés goutte à goutte. Le complexe [Ru(5-méthyl-5'-hydroxyméthyl)(2,2'-bipyridine)₂](PF₆)₂ **17** est dissous dans 2 mL de CH₃CN. La solution de chlorure d'oxalyle et de DMF est transférée à l'aide d'une canule sur la solution contenant le complexe. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 24 h. Le solvant est évaporé sous vide et le produit est redissous dans un minimum d'acétone puis précipité par ajout d'une solution aqueuse saturée de KPF₆. Un solide rouge orangé est obtenu avec un rendement de 95 %.

ESI/MS : $m/z = 777,1$ correspondant à $(M-\text{PF}_6)^+$.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃CN, δ ppm) : 2,22 (3H, s, CH₃) ; 4,54 (2H, s, CH₂) ; 7,42 (4H, m, H_{5'',5'''}) ; 7,54 (1H, s, H₄) ; 7,72 (5H, m, 1 H_{4'} + 4 H_{4'',4'''}) ; 7,89 (1H, d, H₃) ; 8,07 (5H, m, 1 H_{3'} + 4 H_{3'',3'''}) ; 8,42 (2H, 2d, H_{6,6'}) ; 8,51 (4H, d, H_{6'',6'''}).

2.14. Synthèse du complexe [Ru(5-méthyl-5'-azidométhyl-2,2'-bipyridine)(2,2'-bipyridine)₂](PF₆)₂ (19)

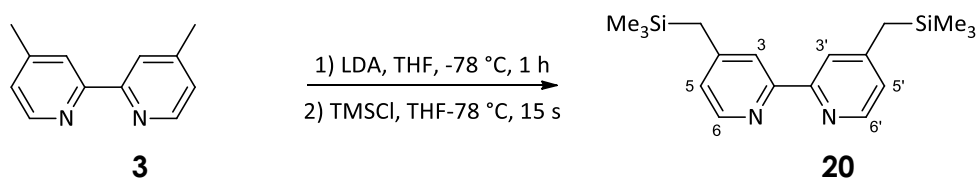


55 mg ($5,95 \cdot 10^{-5}$ mol) de [Ru(5-méthyl-5'-(hydroxy)méthyl-2,2'-bipyridine)(bipyridine)₂](PF₆)₂ **18** et 5,8 mg ($8,92 \cdot 10^{-5}$ mol ; 1,5 eq.) de NaN₃ sont dissous dans 5 mL de DMF anhydre et laissés sous agitation pendant 72 h à température ambiante. Le solvant est évaporé et le complexe est redissous dans un minimum d'acétone puis précipité par l'ajout d'une solution aqueuse saturée de KPF₆. Après filtration, le complexe est chromatographié sur une colonne de silice éluée avec un mélange de CH₃CN/H₂O/solution de KNO₃ saturée 100/20/2. Un solide orange est obtenu avec un rendement de 40 %.

ESI/MS : m/z = 784,1 correspondant à (M-PF₆)⁺.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃CN, δ ppm) : 2,20 (3H, s, CH₃) ; 4,35 (2H, s, CH₂) ; 7,39 (4H, t, H_{5''',5'''}) ; 7,52 (1H, s, H₄) ; 7,59 (1H, s, H_{4'}) ; 7,70 (4H, t, H_{4'',4'''}) ; 7,87 (1H, d, H₃) ; 7,98 (1H, s, H_{3'}) ; 8,05 (4H, t, H_{3'',3'''}) ; 8,37 (1H, d, H₆) ; 8,43 (1H, d, H_{6'}) ; 8,49 (4H, d, H_{6'',6'''}).

2.15. Synthèse de la 4,4'-bis(triméthylsilyl)méthyl-2,2'-bipyridine (20)⁷

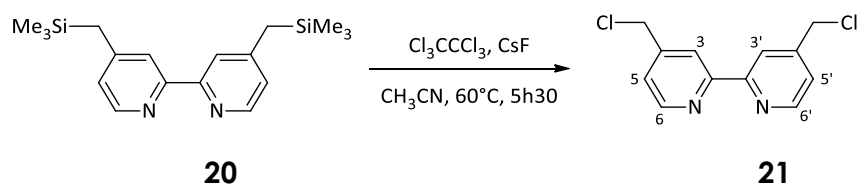


1,9 mL de diisopropylamine ($1,35 \cdot 10^{-2}$ mol ; 2,5 eq.) sont dissous dans 18 mL de THF anhydre et le mélange est porté à -78 °C. 7,47 mL de n-BuLi ($1,19 \cdot 10^{-2}$ mol ; 2,2

eq.) sont ajoutés et la solution est maintenue à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 10 minutes. La solution est mise à $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 10 minutes puis redescendue à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. La 4,4'-bis-méthyl-2,2'-bipyridine **3** (1g, $5,43 \cdot 10^{-3}$ mol ; 1 eq.) est dissoute dans 25 mL de THF anhydre puis transférée à l'aide d'une canule dans le premier mélange réactionnel. La solution est laissée sous agitation pendant 1h à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le chlorure de triméthylsilane (1,73 mL ; $1,35 \cdot 10^{-2}$ mol ; 2,5 eq.) est rapidement ajouté à la solution et la réaction est arrêtée au bout 15 s par ajout de 20 mL de EtOH. Le mélange réactionnel est extrait avec un mélange CH_2Cl_2 /solution de NaHCO_3 saturée. La phase organique est lavée avec une solution de NaCl saturée, séchée sur Na_2SO_4 et filtrée. Après évaporation des solvants, un solide blanc est obtenu avec un rendement de 89 %.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 0,05 (18H, s, CH_3 TMS) ; 2,20 (4H, s, CH_2) ; 6,93 (2H, dd, $\text{H}_{5,5'}$) ; 8,05 (2H, s, $\text{H}_{3,3'}$) ; 8,45 (2H, d, $\text{H}_{6,6'}$).

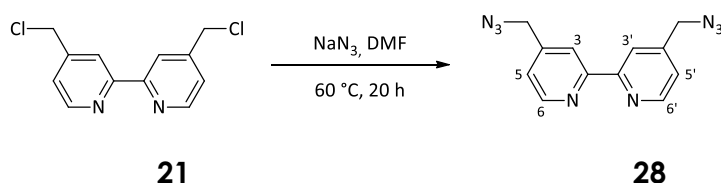
2.16. Synthèse de la 4,4'-bischlorométhyl-2,2'-bipyridine (**21**)⁷



De la 4,4'-bis(triméthylsilyl)méthyl-2,2'-bipyridine **20** (1,595 g ; $4,8 \cdot 10^{-3}$ mol), de l'hexachloroéthane (5,12 g ; $1,94 \cdot 10^{-2}$ mol ; 4 eq.) et du fluorure de césium (2,94 g ; $1,94 \cdot 10^{-2}$ mol ; 4 eq.) sont dissous dans 60 mL de CH_3CN anhydre fraîchement distillé. Le mélange réactionnel est chauffé à $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 5 h 30 min. Le produit est ensuite extrait avec un mélange acétate d'éthyle/ H_2O . La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl , séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. Le produit est chromatographié sur une colonne de silice avec un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole 10/90 et progressivement jusqu'à 40/60. Le produit est ensuite recristallisé dans l'acétate d'éthyle à chaud. Un solide blanc cassé est obtenu avec un rendement de 64 %.

^1H -RMN (300 MHz, CD_3Cl , δ ppm) : 4,64 (4H, s, CH_2) ; 7,39 (2H, dd, $\text{H}_{5,5'}$) ; 8,45 (2H, s, $\text{H}_{3,3'}$) ; 8,70 (2H, d, $\text{H}_{6,6'}$).

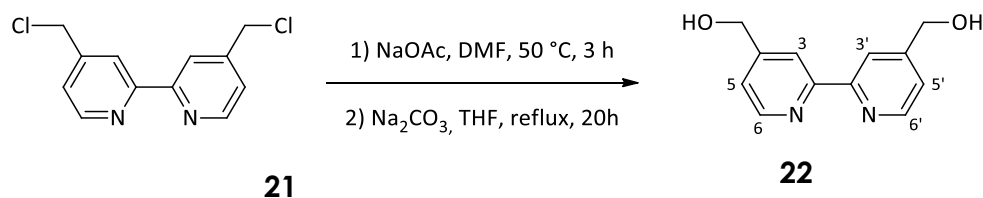
2.17. Synthèse de la 4,4'-bisazidométhyl-2,2'-bipyridine (**28**)⁸



97,8 mg de 4,4'-bis(chlorométhyl)-2,2'-bipyridine **21** ($3,86 \cdot 10^{-4}$ mol) et 62 mg d'azoture de sodium NaN₃ ($9,53 \cdot 10^{-4}$ mol ; 2,5 eq.) sont dissous dans 3 mL de DMF. Le mélange est porté à 60 °C pendant 20 h sous atmosphère d'argon. Le solvant est ensuite évaporé sous vide. Le produit sec est repris dans du CH₂Cl₂ et le NaCl formé est filtré. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice élué à l'éther diéthylique. Une poudre blanche est obtenue avec un rendement de 80 %.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃Cl, δ ppm) : 4,49 (4H, s, CH₂) ; 7,30 (2H, dd, H_{5,5'}) ; 8,37 (2H, s, H_{3,3'}) ; 8,68 (2H, d, H_{6,6'}).

2.18. Synthèse de la 4,4'-bishydroxyméthyl-2,2'-bipyridine (**22**)⁵

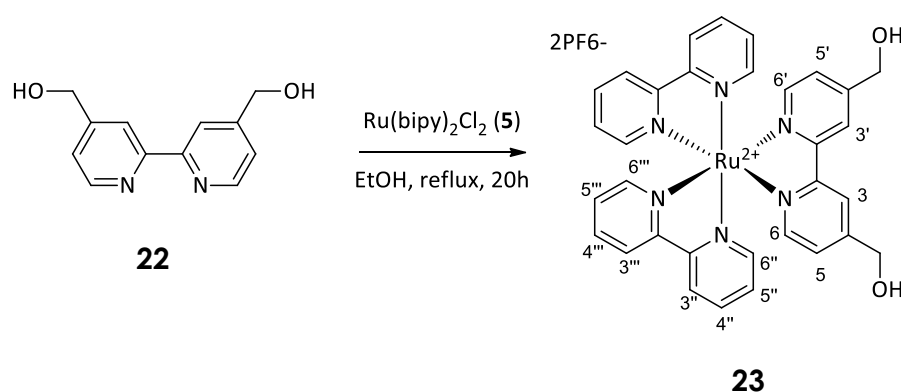


La 4,4'-bis(chlorométhyl)-2,2'-bipyridine (0,785 g ; $3,1 \cdot 10^{-3}$ mol) **21** et de l'acétate de sodium (3,81 g ; $4,65 \cdot 10^{-2}$ mol ; 15 eq.) sont dissous dans 20 mL de DMF séché sur silice. Le mélange est chauffé à 50 °C pendant 3 h sous atmosphère d'argon. Le DMF est évaporé sous vide et le produit est extrait avec un mélange CH₂Cl₂/H₂O. La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le produit est redissous dans 40 mL de THF. Une solution de Na₂CO₃ (1,5 g ; 0,013 mol ; 4 eq.) dans 30 mL H₂O est ajoutée. Le mélange est chauffé à reflux pendant 20 h. Les solvants sont évaporés et le produit est dissous dans de l'eau chaude, puis filtré pour éliminer les espèces insolubles. Le filtrat est concentré et le produit est extrait 4 fois à l'acétate d'éthyle chaud. Les phases organiques sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées. Le produit est chromatographié sur une colonne d'alumine neutre éluée avec un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole 70/30. Un gradient est appliqué allant jusqu'à l'acétate d'éthyle pur. L'ajout

de 2 puis 5 % de méthanol dans l'éluant permet de séparer le produit désiré. Le produit est finalement recristallisé dans l'acétate d'éthyle. Un solide blanc cassé est obtenu avec un rendement de 68 %.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD , δ ppm) : 4,76 (4H, s, CH_2) ; 7,44 (2H, d, $\text{H}_{5,5'}$) ; 8,28 (2H, s, $\text{H}_{3,3'}$) ; 8,61 (2H, d, $\text{H}_{6,6'}$).

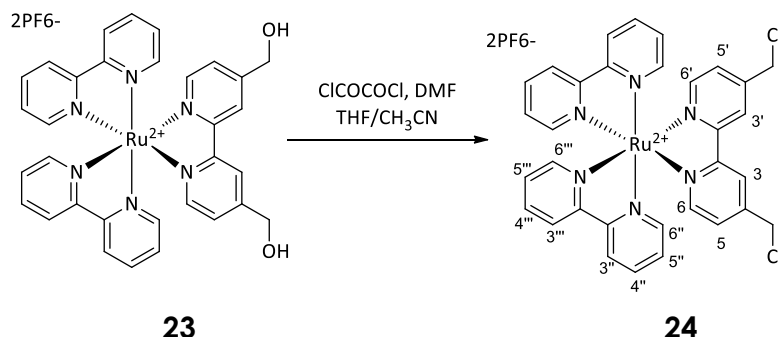
2.19. Synthèse du complexe $[\text{Ru}(4,4'\text{-bishydroxyméthyl-2,2'\text{-bipyridine)}(2,2'\text{-bipyridine})_2](\text{PF}_6)_2$ (**23**)⁶



La 4,4'-bishydroxyméthyl-2,2'-bipyridine **22** (100 mg ; $4,62 \cdot 10^{-4}$ mol ; 1,3 eq.) et le $\text{Ru}(2,2'\text{-bipyridine})_2\text{Cl}_2$ **5** (172 mg ; $3,55 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans 6 mL de EtOH absolu. Le mélange est chauffé à reflux pendant 20 h puis l'éthanol est évaporé. Le produit est extrait avec un mélange H_2O /acétate d'éthyle (3 x 20 mL) pour éliminer le ligand en excès. La phase aqueuse est concentrée et du KPF_6 solide est ajouté. Le précipité formé est filtré et lavé avec un minimum d'eau. Le produit est redissous dans l'eau chaude et précipite en refroidissant. Après filtration et évaporation sous vide, un solide rouge orangé est obtenu avec un rendement de 81 %.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3CN , δ ppm) : 3,72 (2H, s large, OH) ; 4,79 (2H, s, CH_2) ; 7,38 (6H, m, $\text{H}_{5,5',5'',5'''}$) ; 7,62 (2H, d, $\text{H}_{3,3'}$) ; 7,74 (4H, tt, $\text{H}_{3'',3'''}$) ; 8,04 (4H, td, $\text{H}_{4',4''}$) ; 8,47 (6H, d, $\text{H}_{6,6',6'',6'''}$).

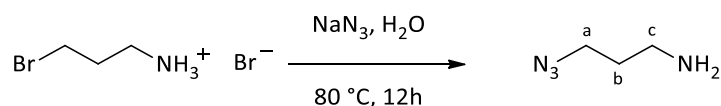
2.20. Synthèse du complexe $[Ru(4,4'$ -bischlorométhyl-2,2'-bipyridine) $(2,2'$ -bipyridine) $](PF_6)_2$ (**24**)⁶



0,2 mL de chlorure d'oxalyle ($2,31 \cdot 10^{-3}$ mol ; 8 éq.) sont dilués dans 15 mL de THF. La solution est portée à 0 °C puis 0,18 mL de DMF ($0,87 \cdot 10^{-3}$ mol ; 3 eq.) sont ajoutés en goutte à goutte pour garder la température à 0 °C. Après 15 minutes à 0 °C, 100 mg du complexe $[Ru(4,4'$ -bishydroxyméthyl-2,2'-bipyridine) $(2,2'$ -bipyridine) $](PF_6)_2$ **23** ($0,29 \cdot 10^{-3}$ mol) sont ajoutés au mélange. Celui-ci est ensuite mis à température ambiante et laissé sous agitation pendant 15 h. À la fin de la réaction, les solvants sont évaporés sous vide. Le complexe est redissous dans un minimum d'acétone et précipité par ajout d'une solution aqueuse saturée de KPF_6 . Après filtration, le produit sec est récupéré par dissolution dans l'acétonitrile qui est ensuite évaporé sous vide. Le complexe est purifié par chromatographie sur plaque de silice préparative (2 mm d'épaisseur) éluée avec un mélange acétonitrile/ H_2O /solution de KNO_3 saturée de proportions 100/20/2. Les fractions contenant le complexe sont séchées et redissoutes dans un minimum d'acétone. Le complexe est précipité par ajout d'une solution aqueuse de KPF_6 saturée. Après lavage avec H_2O , filtration, redissolution dans l'acétonitrile et séchage sous vide, une poudre rouge orangée est obtenue avec un rendement de 96 %.

1H -RMN (300 MHz, CD_3CN , δ ppm) : 4,80 (4H, s, CH_2) ; 7,39 (6H, m, $H_{5,5',5'',5'''}$) ; 7,71 (6H, m, $H_{6,6',6'',6'''}$) ; 8,06 (4H, tt, $H_{4'',4''''}$) ; 8,48 (4H, d, $H_{3'',3''''}$) ; 8,56 (6H, s, $H_3, 3'$).

2.21. Synthèse du 1-amino-3-azidopropane⁹

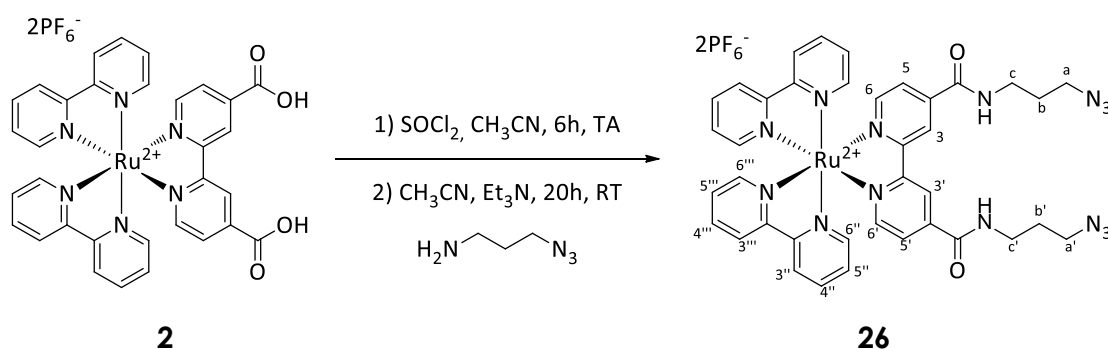


11,2 g ($3,5 \cdot 10^{-2}$ mol) de bromure de 3-bromo-1-propylammonium et 11 g d'azoture de sodium NaN_3 (0,17 mol ; 5 eq.) sont dissous dans 25 mL d' H_2O . La solution est laissée sous agitation pendant 12 h à 80 °C sous argon. La solution est concentrée aux deux tiers sous vide, le produit précipite. La solution est diluée avec 100 mL d' Et_2O et mise à basse température ($0\text{ °C} < T < 10\text{ °C}$). 6 g de KOH sont ajoutés petit à petit en contrôlant la température pour qu'elle ne dépasse pas 10 °C. La phase aqueuse est séparée de la phase organique. La phase aqueuse est extraite avec 3x50 mL d' Et_2O . Les phases organiques sont séchées sur K_2CO_3 , filtrées et évaporées sous vide. Un liquide jaune pâle est obtenu avec un rendement de 57 %.

Infrarouge : bande à 2097 cm^{-1} caractéristique de la présence de N_3 .

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 1,71 (2H, quintuplet, CH_2b) ; 2,79 (2H, t, CH_2c) ; 3,36 (2H, t, CH_2a).

2.22. Synthèse du complexe $[\text{Ru}(4,4'\text{-bis}(N\text{-}(3''\text{-azidopropyl)amino-carbonyl)-2,2'\text{-bipyridine})(2,2'\text{-bipyridine})_2](\text{PF}_6)_2$ (**26**)



106 mg ($1,12 \cdot 10^{-4}$ mol) du complexe $[\text{Ru}(4,4'\text{-biscarboxy-2,2'\text{-bipyridine})(2,2'\text{-bipyridine})_2](\text{PF}_6)_2$ **2** sont dissous dans 20 mL de CH_3CN anhydre fraîchement distillé et mis sous argon. 1,2 mL ($16,4 \cdot 10^{-3}$ mol ; 150 eq.) de SOCl_2 sont ajoutés et la solution

est mise sous agitation pendant 6 h à température ambiante. Le solvant est évaporé à sec.

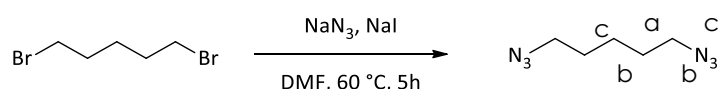
Le produit brut est redissous dans 40 mL de CH₃CN anhydre fraîchement distillé et la solution est mise à 0 °C. 110 mg (1,1.10⁻³ mol ; 10 eq.) de 1-amino-3-azidopropane sont dissous dans 80 mL de CH₃CN anhydre fraîchement distillé et 0,6 mL de Et₃N sont ajoutés à la solution. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 20 h. 3 mL d'eau sont ajoutés et l'acétonitrile est évaporé sous vide. Le produit précipite à l'ajout d'une solution aqueuse saturée de KPF₆. Le produit est filtré et purifié par chromatographie flash sur colonne de silice 50 µm. Les éluants utilisés sont un mélange acétonitrile/eau/solution saturée de KNO₃ 100/10/1 puis un mélange 100/40/2. Une poudre rouge métallique est obtenue avec un rendement de 43 %.

ESI/MS : m/z = 966,5 correspondant à (M-PF₆)⁺.

¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂CO, δ ppm) : 1,89 (4H, quintuplet, CH₂_{b,b'}) ; 3,45 (4H, t, CH₂_{a,a'}) ; 3,53 (4H, m, CH₂_{c,c'}) ; 7,56 (4H, m, H_{5'',5'''}) ; 7,91 (2H, dd, H_{6,6'}) ; 8,03 (4H, t, H_{4'',4'''}) ; 8,18 (2H, m, H_{6'',6'''}) ; 8,21 (4H, d, H_{5,5'}) ; 8,80 (4H, d, H_{3,3'}) ; 9,13 (2H, s, H_{3,3'}).

¹³C-RMN (75 MHz, (CD₃)₂CO, δ ppm) : 30 (C_{b,b'} dans le massif de l'acétone) ; 37 (C_{a,a'}) ; 49 (C_{c,c'}) ; 122 (C_{3,3'}) ; 124 (C_{3'',3'''}) ; 125 (C_{6,6'}) ; 128 (C_{5'',5'''}) ; 138 (C_{6'',6'''}) ; 142 (C_{2,2'}) ; 151 (C_{4'',4'''}) ; 153 (C_{5,5'}) ; 157,0 (C_{4,4'}) ; 157,1 (C_{2'',2'''}) ; 163 (C carbonyles).

2.23. Synthèse du 1,5-bisazidopentane

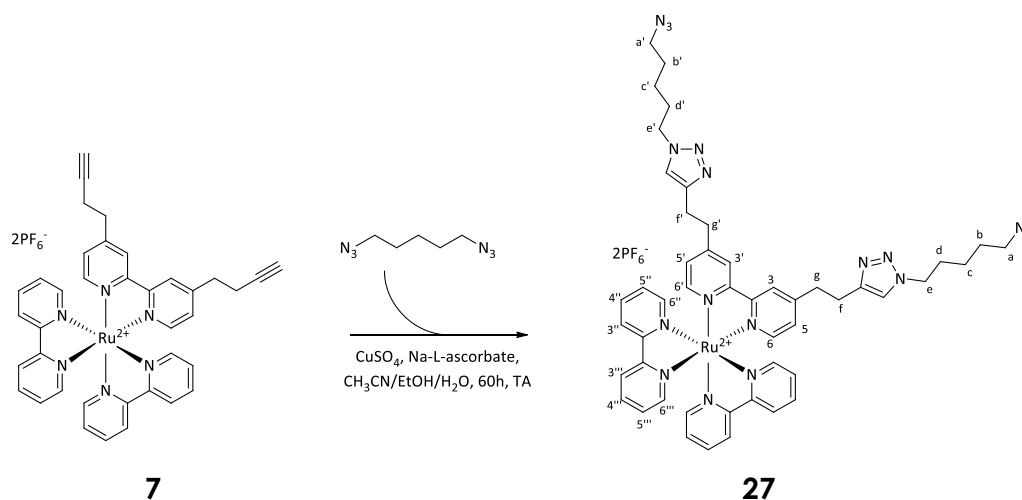


2,4 mL (1,74.10⁻² mol) de 1,5-dibromopentane et 3,4 g (5,22.10⁻² mol ; 3 eq.) d'azoture de sodium NaN₃ sont dissous dans 30 mL de DMF anhydre et la solution est chauffée à 60 °C et agitée pendant 5 h. Le DMF est évaporé puis le produit est dissous dans de l'eau et extrait avec 3x30 mL d'Et₂O. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporés sous vide. Le produit est purifié par chromatographie sur une colonne de silice éluee avec un mélange éther de pétrole/Et₂O de proportions 90:10.

Infrarouge : bande à 2092 cm⁻¹ caractéristique de la présence de N₃.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 1,43 (2H, m, CH₂_a) ; 1,59 (4H, tt, CH₂_b) ; 3,25 (4H, t, CH₂_c).

2.24. Synthèse du complexe [Ru(4,4'-bis(2-(1-(5''-azidopentyl)-1-triazol-4-yl)éthyl)-2,2'-bipyridine)(2,2'-bipyridine)₂](PF₆)₂ (27)



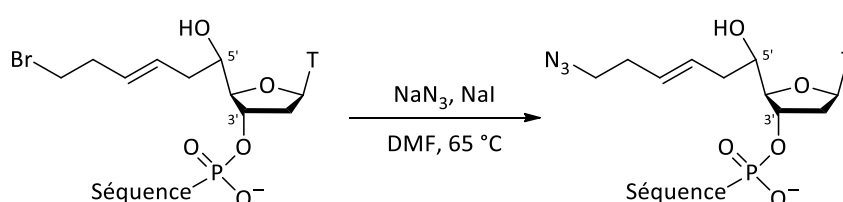
Le complexe **7** (20 mg ; $2,08 \cdot 10^{-5}$ mol) est dissous dans 0,5 mL de CH₃CN, le 1,5-bisazidopentane (96 mg ; $6,23 \cdot 10^{-4}$ mol ; 30 eq.) dans 1 mL de EtOH, le sulfate de cuivre CuSO₄ (20,8 µL d'une solution aqueuse à 1 mol.L⁻¹ ; $2,08 \cdot 10^{-5}$ mol ; 1 eq. ; fraîchement préparée) et du Na-L-ascorbate (20,8 µL d'une solution aqueuse à 1 mol.L⁻¹ ; $2,08 \cdot 10^{-5}$ mol ; 1 eq. ; fraîchement préparée) sont mélangés et 0,5 mL de H₂O sont ajoutés. Au bout de 24 h de réaction, la même quantité de CuSO₄ et de Na-L-ascorbate (20,8 µL de solutions à 1 mol.L⁻¹ ; 1 eq.) sont ajoutés, ainsi qu'au bout de 48 h de réaction. Après 60 h de réaction, les solvants sont évaporés sous vide et le produit est redissous dans un minimum d'acétone puis précipité par ajout d'une solution aqueuse de KPF₆ saturée. Le précipité est filtré et lavé avec de l'eau et de l'éther diéthylique. Le précipité est ensuite dissous dans du CH₃CN qui est par la suite évaporé sous vide. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice éluée avec un mélange acétonitrile/eau/solution saturée de KNO₃ 100/10/1. Les fractions rassemblées sont évaporées sous vide et le produit est redissous dans un minimum d'acétone puis précipité par ajout d'une solution aqueuse saturée de KPF₆. Le précipité est filtré et lavé à l'eau abondamment, puis redissous dans du CH₃CN qui est ensuite évaporé sous vide. Une poudre orange est obtenue avec un rendement de 34 %.

ESI/MS : m/z = 491,2 correspondant à (M-2PF₆)²⁺.

¹H-RMN (300 MHz, CH₃CN, δ ppm) : 1,25 (4H, m, CH_{2c}) ; 1,47 (4H, tt, CH_{2d}) ; 1,75 (4H, tt, CH_{2b}) ; 3,14 (12H, m, CH_{2e+f+g}) ; 4,19 (4H, t, CH_{2a}) ; 7,23 (2H, dd, CH_{5,5'}) ; 7,42 (4H, tm, CH_{5'',5'''}) ; 7,54 (2H, d, CH_{6,6'}) ; 7,68 (4H, dm, CH_{6'',6'''}) ; 8,06 (4H, quadruplet-d, CH_{4'',4'''}) ; 8,35 (2H, sd, CH_{3,3'}) ; 8,49 (4H, dd, CH_{3'',3'''}).

^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3CN , δ ppm) : 24 ($\text{C}_{\text{f},\text{f}'}$) ; 27 ($\text{C}_{\text{c},\text{c}'}$) ; 29 ($\text{C}_{\text{b},\text{b}'}$) ; 31 ($\text{C}_{\text{g},\text{g}'}$) ; 36 ($\text{C}_{\text{a},\text{a}'}$) ; 51 ($\text{C}_{\text{d},\text{d}'}$) ; 52 ($\text{C}_{\text{e},\text{e}'}$) ; 123 ($\text{C}_{3,3'}$) ; 125,6 ($\text{C}_{3'',3''''}$) ; 125,8 ($\text{C}_{6,6'}$) ; 129 ($\text{C}_{5'',5''''}$) ; 139 ($\text{C}_{6'',6''''}$) ; 147 ($\text{C}_{2,2'}$) ; 152 ($\text{C}_{5,5'}$) ; 152,8 ($\text{C}_{4'',4''''}$) ; 153 ($\text{C}_{\text{i},\text{i}'}$) ; 155 ($\text{C}_{2'',2''''}$) ; 158 ($\text{C}_{4,4'}$) ; 159 ($\text{C}_{\text{h},\text{h}'}$).

3. Synthèse de l'oligonucléotide substitué par une fonction azoture en position 5'-10,11



Séquence nucléique utilisée : 5'-XTC CAG AAG TCA TGC-3' où X représente la thymidine modifiée du schéma ci-dessus.

200.10⁻⁹ mol de la séquence substituée par un Br en 5' - conservée sur support, du NaN_3 (2,6 mg ; 40.10⁻⁶ mol ; 200 eq.) et du NaI (6 mg ; 40.10⁻⁶ mol ; 200 eq.) sont mélangés dans 400 μL de DMF. Le mélange est porté à 65 °C pendant 1 h et 15 min. La séquence sur support est ensuite filtrée sur spin-X puis lavée avec 2x400 μL de DMF puis 400 μL de CH_2Cl_2 . Le support est ensuite séché par un flux d'argon. Les billes de support sèches sont récupérées et mises dans 500 μL d'une solution de NH_4OH à température ambiante pendant une nuit. Les billes de support sont enfin filtrées, le filtrat est évaporé et le culot sec est purifié en HPLC préparative. Gradient :

Temps	Débit	TEAA (50.10 ⁻³ mol.L ⁻¹)	CH ₃ CN
0	4,726	95	5
1,39	4,726	95	5
15,89	4,726	70	30
16,89	4,726	70	30
17,89	4,726	95	5

Le produit donne un spectre de spectrométrie UV-vis avec un maximum d'absorbance à 260 nm. Il a été possible d'obtenir un spectre MALDI-TOF de la séquence isolée par HPLC, mais la masse ne correspond pas à ce que nous pouvons attendre dû à un mauvais calibrage de l'appareil. Cependant, l'analyse de la séquence étalon portant une fonction NH₂ au lieu de N₃ présente le même décalage. Enfin, la masse du produit obtenu ne correspondant pas au produit NH₂, seul produit obtenu après passage de la séquence fonctionnalisée par un Br en 5' dans NH₄OH, il peut être supposé que le produit attendu a été obtenu.

4. Synthèse des molécules hybrides ruthénium/ADN

4.1. Synthèse par amidation et caractérisation

4.1.1. Séquences nucléiques utilisées

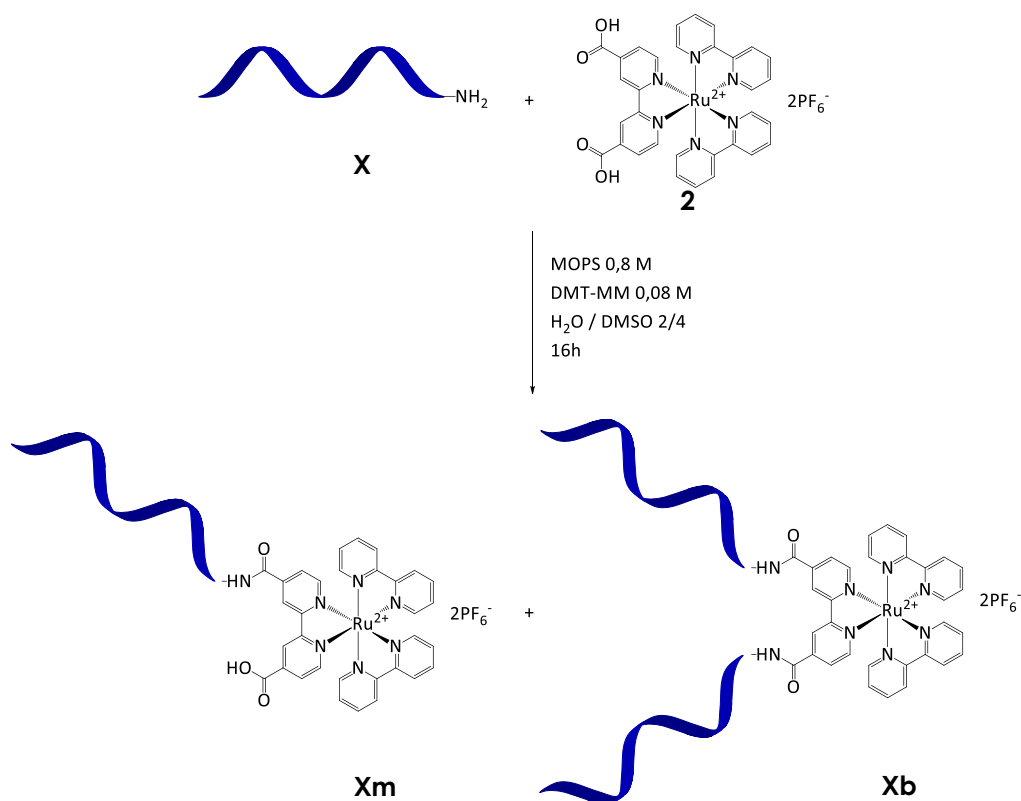
Les cartouches d'ODN dont les séquences sont fonctionnalisées en position 5' par un aminohexyle protégé par un groupement monométhoxytrityl (MMT) sont commerciales.

Sé- quence	Nombre de bases	Séquences déprotégées
1	14	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -AGG TCT TCA GTA CG-3'
2	14	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -CGT ACT GAA GAC CT-3'
3	20	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -GAG ACT CGA CGC TGC ATG AG-3'
4	20	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -CTC ATG CAG CGT CGA GTC TC-3'
5	24	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -GTA GCA AGC CTG CCT CTG AGT CCG-3'
6	24	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -CGG ACT CAG AGG CAG GCT TGC TAC-3'
7	34	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -CGT ACT GAA GAC CT CTC ATG CAG CGT CGA GTC TC-3'
8	58	5'-NH ₂ (CH ₂) ₆ -CGT ACT GAA GAC CT CTC ATG CAG CGT CGA GTC TC GTA GCA AGC CTG CCT CTG AGT CCG-3'

4.1.2. Procédure générale pour la déprotection de la fonction amine terminale des ODNs sur support

1 mL d'une solution d'acide trichloroacétique à 3 % dans le CH₂Cl₂ est passé en *push-pull* pendant 3 min dans une cartouche d'un ODN de 200.10⁻⁹ mol. La solution passe d'incolore à un jaune-orangé soutenu. Cette opération est répétée 4 fois jusqu'à ce que la couleur jaune disparaisse. La cartouche est ensuite rincée 1 fois avec du CH₂Cl₂ en *push-pull* puis ensuite 1 fois avec de l'acétonitrile. Finalement, la cartouche est séchée à l'aide d'un flux d'argon.

4.1.3. Procédure générale pour la synthèse d'hybrides complexes de ruthénium-ADN par synthèse peptidique¹²



Le complexe [Ru(4,4'-biscarboxy-2,2'-bipyridine)(bis-2,2'-bipyridine)](PF₆)₂ **2** (4,7 mg ; 5 μmol ; 25eq. ; 8,3.10⁻⁴ mol.L⁻¹ final) est dissous dans 4 mL de DMSO. L'acide 3-(N-morpholino)propane-sulfonique MOPS (1,046 g ; 5 mmol ; 0,8 mol.L⁻¹ final) est dissous dans 2 mL d'H₂O ultrapure. Le pH est ajusté à 7 à l'aide d'une solution de NaOH à 5 mol.L⁻¹. Cette solution est reprise pour dissoudre le DMT-MM

(138,04 mg ; 0.5 mmol ; 0,08 mol.L⁻¹ final), puis ajoutée à la solution contenant le ruthénium. Les billes supportant l'ADN (200 nmol ; 3,33.10⁻⁵ mol.L⁻¹ final) sont ajoutées à la solution obtenue et celle-ci est soumise à une agitation continue sur 48h à température ambiante. Après réaction, les billes d'oligonucléotides sont filtrées sur Spin X et lavées avec du DMSO puis avec de l'eau ultrapure. Les billes sont ensuite mises dans une solution de NH₄OH à 32 % à 50°C pendant 20h. Les billes sont ensuite filtrées sur tube spin-X et le filtrat d'ammoniaque est évaporé. Le culot sec est redissous dans un minimum d'H₂O ultrapure et la solution est purifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 20% en conditions dénaturantes. Le gel est observé sous lampe UV à 254 et 365 nm sur une plaque de silice, ainsi que sur la table d'illumination Safe Imager™. Les bandes correspondant aux complexes de ruthénium liés à un et deux brins d'ADN sont découpées du gel, broyées, dissoutes dans H₂O puis laissées à 55°C pendant 20h. Les solutions sont filtrées sur tube spin-X, dialysées sur des tubes de dialyse Amicon Ultra 3 kD puis évaporées. Un rendement approximatif est calculé sur la base de 200.10⁻⁹ mol d'ADN modifié : 20 % de **Xm** et 20 % de **Xb**. Ce rendement est calculé sur la base des concentrations des solutions des produits en regardant leur absorption à $\lambda = 260$ nm par spectrophotométrie UV-vis.

Les spectres de masse des hybrides ont pu être obtenus en masse haute résolution pour les hybrides **1m**, **2m**, **2b**, **3m**, **4m**, **4b**, et **5m**. Les autres spectres de masse n'ont pas été obtenus mais leurs migrations sur les gels d'électrophorèse confirment leurs structures. Les valeurs obtenues pour les masses sont données dans le tableau suivant.

Produit	Formule Brute	Masse théorique		Masse expérimentale		Différence (ppm)
		Charges positives		Charges positives		
1m	C ₁₇₅ H ₂₁₀ N ₅₉ O ₈₉ P ₁₄ Ru	4	1273,7359	4	1273,752	12,6
		5	1019,1903	5	1019,1924	2,1
		6	849,4932	6	849,4952	2,4
2m	C ₁₇₄ H ₂₀₉ N ₆₀ O ₈₇ P ₁₄ Ru	4	1265,9873	4	1265,9893	1,6
		5	1012,9914	5	1012,9915	0,1
		6	844,3274	6	844,3308	4,0
2b	C ₃₁₆ H ₃₉₄ N ₁₁₄ O ₁₇₀ P ₂₈ Ru	5	1894,5562	5	1894,6682	59,1
		6	1578,9648	6	1578,9386	16,6
		7	1353,5424	7	1353,625	61,0
3m	C ₂₃₃ H ₂₈₁ N ₈₈ O ₁₂₂ P ₂₀ Ru	3	2327,0851	3	2327,0852	0,0
		4	1745,5658	4	1745,5606	3,0
		5	1396,6542	5	1396,6616	5,3
4m	C ₂₃₁ H ₂₈₃ N ₇₈ O ₁₂₆ P ₂₀ Ru	4	1721,0569	4	1721,043	8,1
		5	1377,0471	5	1377,079	23,2
		6	1147,7072	6	1147,7289	18,9
4b	C ₄₃₀ H ₅₄₂ N ₁₅₀ O ₂₄₈ P ₄₀ Ru	5	2622,6677	5	2622,8994	88,3
		6	2185,7244	6	2185,9023	81,4
		7	1873,622	7	1873,9703	185,9
5m	C ₂₇₁ H ₃₃₀ N ₁₀₁ O ₁₄₇ P ₂₄ Ru	5	1638,8924	5	1638,973	49,2
		6	1365,9117	6	1365,98	50,0
		7	1170,9254	7	1170,936	9,1

4.2. Synthèse des molécules hybrides ruthénium/ADN par Click Chemistry et caractérisation

4.2.1. Séquences nucléiques utilisées

Les synthèses par *click chemistry* (CuAAC) ont été effectuées à l'aide de séquences d'acides nucléiques fonctionnalisées en position 5' - par un hexyne et disponibles commercialement. Les séquences choisies sont de deux longueurs : 14 et 24 bases.

Séquence	Nombre de bases	Séquences
9	14	5'-HC≡C(CH ₂) ₄ -GCA TGA CTT CTG GA-3'
10	14	5'-HC≡C(CH ₂) ₄ -TCC AGA AGT CAT GC-3'
5a	24	5'-HC≡C(CH ₂) ₄ -GTA GCA AGC CTG CCT CTG AGT CCG-3'
6a	24	5'-HC≡C(CH ₂) ₄ -CGG ACT CAG AGG CAG GCT TGC TAC-3'

4.2.2. Procédure générale pour la synthèse des molécules hybrides ruthénium/ODN par CuAAC

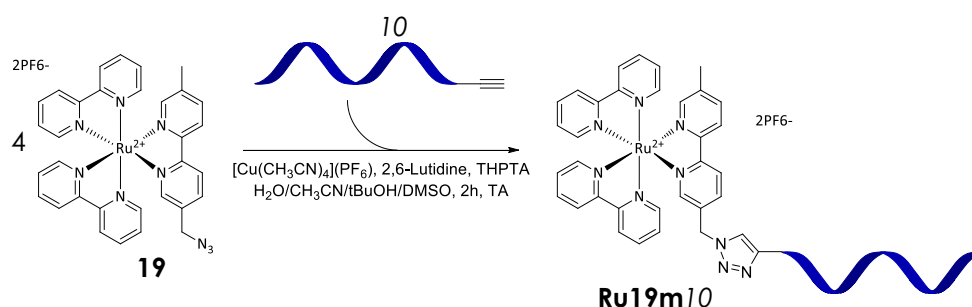
4.2.2.1. Méthode et solutions employées

Les volumes finaux des réactions sont d'environ 45 μL et la concentration en ODN finale recherchée est d'environ 10^{-4} mol.L⁻¹.

La réaction a lieu dans un mélange de solvants H₂O/CH₃CN/tBuOH/DMSO dans des proportions proches de 18/13/8/2. Ce mélange est obtenu par l'utilisation lors des réactions de solutions dégazées à l'argon de [Cu(CH₃CN)₄](PF₆) dans l'acétonitrile (0,05 mol.L⁻¹), de 2,6-lutidine (0,25 mol.L⁻¹), de ligand THPTA dans l'eau (0,01 mol.L⁻¹), et d'un mélange de solvants Tampon tris pH = 7/t-BuOH/DMSO dans les proportions 10/8/2. À ces solutions s'ajoutent les solutions d'ODN préparées dans l'eau et celles des différents complexes de ruthénium préparés dans l'acétonitrile.

Tous les mélanges réactionnels sont sous atmosphère d'argon pendant les 2h de réaction. Les milieux réactionnels sont enfin directement analysés par PAGE.

4.2.2.2. Synthèse des molécules formées d'un complexe de ruthénium lié à un ODN

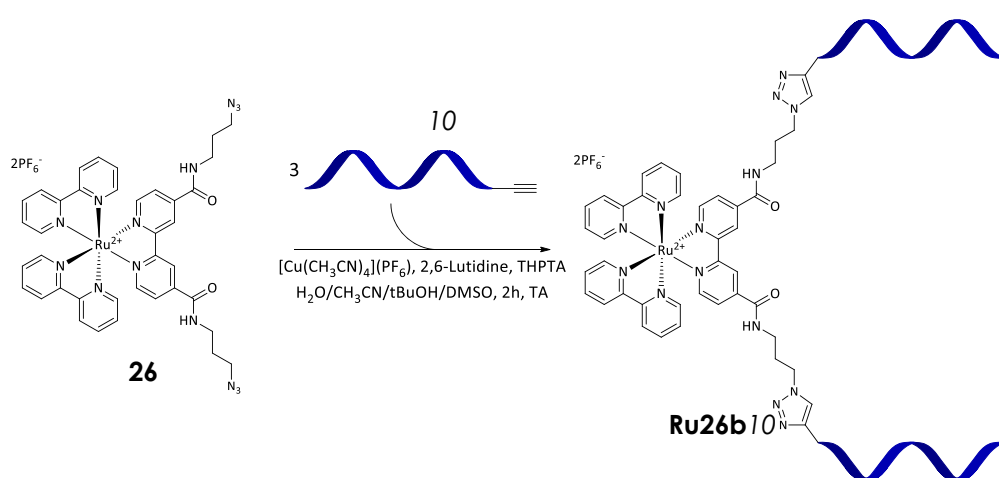


Pour cette synthèse, 1 μL d'une solution de [Cu(CH₃CN)₄](PF₆)₂ ($500 \cdot 10^{-9}$ mol ; 100 eq.), 3 μL de ligand THPTA ($30 \cdot 10^{-9}$ mol ; 6 eq.), 4 μL de 2,6-lutidine ($10 \cdot 10^{-9}$ mol ;

2 eq.) ainsi que 20 μL du mélange de solvants $\text{H}_2\text{O}/\text{tBuOH}/\text{DMSO}$ dans des proportions 10/8/2 sont mélangés. 8 μL d'une solution du complexe **19** à $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans l'acétonitrile ($20 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$; 4 eq.) puis 5 μL d'une solution de l'ODN **10** à $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans l'eau (5 nmol) sont ajoutés. La solution est agitée pendant 2 h sous atmosphère d'argon à température ambiante.

La réaction est identique en utilisant l'ODN **5a** et permet d'obtenir la molécule **Ru19m5a**.

4.2.2.3. Synthèse des molécules formées d'un complexe de ruthénium lié à deux ODNs identiques



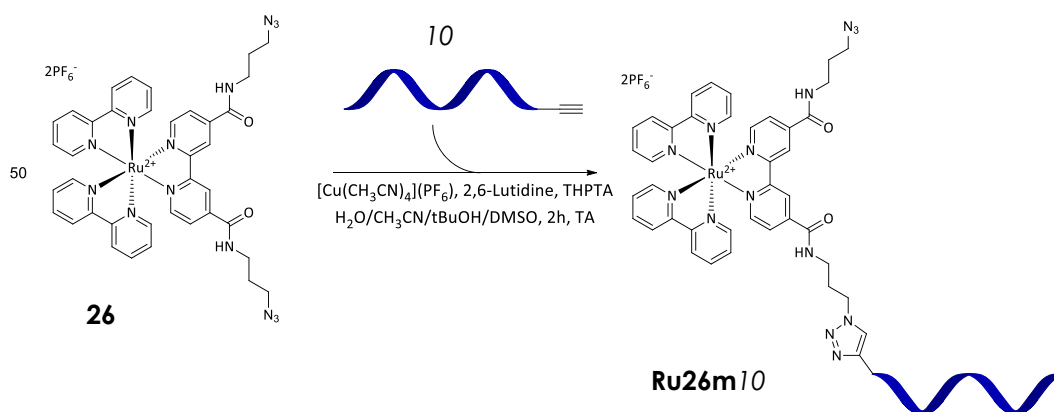
Pour cette synthèse, 15 μL d'une solution de l'ODN **10** à $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans l'eau (15 nmol ; 3 eq.) sont utilisés et 1 μL de $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4](\text{PF}_6)_2$ ($500 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$; 100 eq.), 4 μL de 2,6-lutidine ($10 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$; 2 eq.) ainsi que 3 μL de ligand THPTA ($30 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$; 6 eq.) sont ajoutés. Enfin, 2,5 μL d'une solution du complexe **26** à $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans l'acétonitrile ($5 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$) et 20 μL du mélange de solvants $\text{H}_2\text{O}/\text{tBuOH}/\text{DMSO}$ dans des proportions 10/8/2 sont ajoutés. La réaction est mise pendant 2 h à température ambiante sous flux d'argon.

Pour cette synthèse, 1 μL d'une solution de $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4](\text{PF}_6)_2$ ($500 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$; 100 eq.), 3 μL de ligand THPTA ($30 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$; 6 eq.), 4 μL de 2,6-lutidine ($10 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$; 2 eq.) ainsi que 20 μL du mélange de solvants $\text{H}_2\text{O}/\text{tBuOH}/\text{DMSO}$ dans des proportions 10/8/2 sont mélangés. 2,5 μL d'une solution du complexe **26** à $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans l'acétonitrile ($5 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$) puis 15 μL d'une solution de l'ODN **10** à $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans l'eau (15 nmol ; 3 eq.) sont ajoutés. La solution est agitée pendant 2 h sous atmosphère d'argon à température ambiante.

La réaction est identique en utilisant l'ODN 5a et permet d'obtenir la molécule **Ru26b5a**. Une réaction identique avec le complexe de ruthénium **27** permet d'obtenir la molécule **Ru27b10**. Enfin, la même réaction avec la bipyridine **28** permet d'obtenir la molécule **Bipyridine28b9**.

4.2.2.4. Synthèse des molécules formées d'un complexe de ruthénium lié à deux ODNs différents

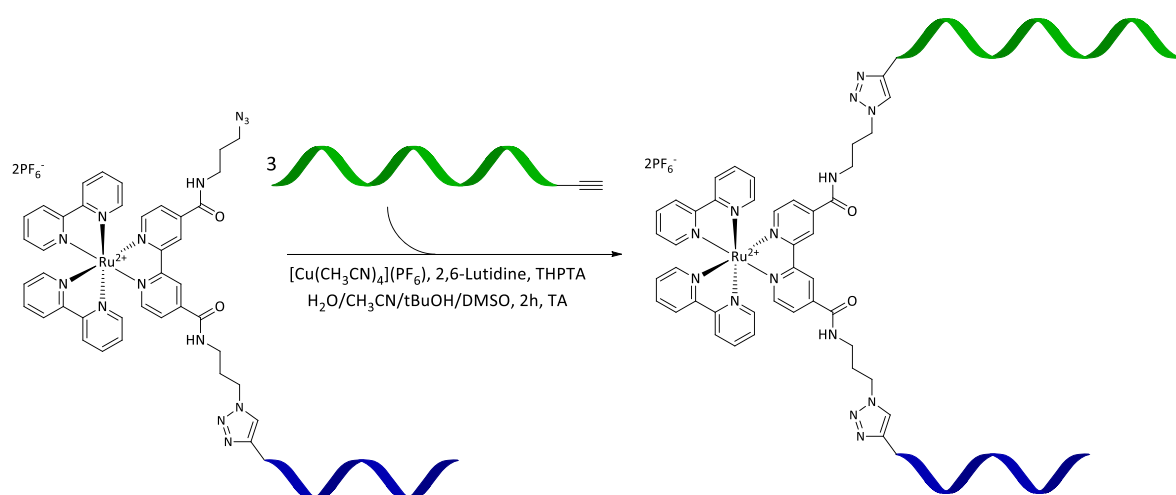
4.2.2.4.1. 1^{ère} étape



Pour cette synthèse, 1 μL d'une solution de $[Cu(CH_3CN)_4](PF_6)_2$ ($500 \cdot 10^{-9}$ mol ; 100 eq.), 3 μL de ligand THPTA ($30 \cdot 10^{-9}$ mol ; 6 eq.), 4 μL de 2,6-lutidine ($10 \cdot 10^{-9}$ mol ; 2 eq.) ainsi que 20 μL du mélange de solvants $H_2O/tBuOH/DMSO$ dans des proportions 10/8/2 sont mélangés. 12,5 μL d'une solution du complexe **26** à $2 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ dans l'acétonitrile ($250 \cdot 10^{-9}$ mol ; 50 eq.) puis 5 μL d'une solution de l'ODN 10 à $1 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ dans l'eau (5 nmol) sont ajoutés. La solution est agitée pendant 2 h sous atmosphère d'argon à température ambiante.

Le produit de la réaction est ensuite lavé et dialysé à l'aide d'un tube Amicon Ultra 3 kD avec une solution H_2O/CH_3CN 8/2, la membrane n'acceptant que 20 % d'acétonitrile maximum.

4.2.2.4.2. 2^{ème} étape



Pour cette synthèse, 1 μL d'une solution de $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4](\text{PF}_6)_2$ ($500 \cdot 10^{-9}$ mol ; 100 eq.), 3 μL de ligand THPTA ($30 \cdot 10^{-9}$ mol ; 6 eq.), 4 μL de 2,6-lutidine ($10 \cdot 10^{-9}$ mol ; 2 eq.) ainsi que 20 μL du mélange de solvants $\text{H}_2\text{O}/\text{tBuOH}/\text{DMSO}$ dans des proportions 10/8/2 sont mélangés. Le produit de la réaction précédente est ajouté ainsi que 15 μL d'une solution de l'ODN 5a à $1 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ dans l'eau (15 nmol ; 3 eq.). La solution est agitée pendant 2 h sous atmosphère d'argon à température ambiante.

4.2.3. Visualisation des molécules

Les molécules obtenues ont toutes été visualisées par électrophorèse sur gels de polyacrylamide (20 %) dans des conditions dénaturantes (présence d'urée). La migration se fait à l'aide d'un tampon TBE (Tris OH, acide borique, EDTA) à température ambiante et sous un courant de 25 mA pendant environ 4 h. La visualisation des gels se fait sur une plaque de silice sous $\lambda = 260$ nm et $\lambda = 365$ nm, ainsi que sur la table d'illumination Safe Imager™.

5. Assemblage des structures linéaires et étoilées

5.1. Hybridation des structures

Les structures linéaires et étoilées ainsi que les duplex d'ADN ont été assemblées en introduisant les molécules hybrides Complexes de ruthénium/ADN ou les

simple-brins dans les proportions stœchiométriques voulues. Les solutions sont diluées dans du tampon TMS ($50 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ Tris, $100 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl, $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ MgCl_2), pour obtenir un volume total de $30 \mu\text{L}$ pour une concentration finale de 20 à $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ en duplex ou en assemblages. Ces solutions sont portées à 90°C pendant 3 minutes puis laissées redescendre à température ambiante le plus lentement possible. Les solutions sont ensuite mises à 4°C pendant 20 h, puis déposées directement sur le gel de PAGE.

5.2. Caractérisation des structures

5.2.1. Visualisation PAGE

Les solutions sont mises à migrer par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (10 %) en conditions natives (absence d'urée) à l'aide d'un tampon TBE (Tris OH, acide borique, EDTA) sous un courant de 15 mA pendant environ 6 h. La migration des gels se fait en salle froide, à 7°C , de manière à éviter que les structures se dissocient lors de la migration par réchauffement du gel. Le gel est par ailleurs placé dans la salle froide à l'avance pour le laisser descendre en température. La visualisation des gels se fait sur une plaque de silice sous $\lambda = 260 \text{ nm}$ et $\lambda = 365 \text{ nm}$, ainsi que sur la table d'illumination Safe Imager™.

5.2.2. Mesures de T_m , émission de luminescence et dichroïsme circulaire

Les mesures des températures de dénaturations T_m , de l'émission de luminescence ainsi que de dichroïsme circulaire des assemblages linéaires et étoilés ont été faites avec des solutions à $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ dans des cuves en quartz de $300 \mu\text{L}$ avec un trajet optique de 1 cm. Les analyses de luminescence et de dichroïsme ont été faites à la température de 10°C pour garder les structures hybridées. Les spectres d'émission ont été effectués avec une excitation à $\lambda = 458 \text{ nm}$ correspondant au maximum d'absorbance du complexe de ruthénium.

- (1) Terpetschnig, E.; Szmecinski, H.; Malak, H.; Lakowicz, J. R. *Biophysical Journal* **1995**, *68*, 342.
- (2) Haberecht, M. C. B., Michael; Bats, Jan W.; Lerner, Hans-Wolfram; Wagner, Matthias *Zeitschrift fuer Naturforschung, B: Chemical Sciences* **2005**, *60*, 745.
- (3) Schubert, U. S.; Eschbaumer, C.; Hochwimmer, G. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 8643.
- (4) Savage, S. A.; Smith, A. P.; Fraser, C. L. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 10048.
- (5) Smith, A. P.; Corbin, P. S.; Fraser, C. L. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 2787.
- (6) Collins, J. E.; Lamba, J. J. S.; Love, J. C.; McAlvin, J. E.; Ng, C.; Peters, B. P.; Wu, X.; Fraser, C. L. *Inorganic Chemistry* **1999**, *38*, 2020.
- (7) Smith, A. P.; Lamba, J. J. S.; fraser, C. L. *Organic Synthesis* **2002**, *78*, 82.
- (8) Xing, B.; Yu, C.-W.; Ho, P.-L.; Chow, K.-H.; Cheung, T.; Gu, H.; Cai, Z.; Xu, B. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 4904.
- (9) Srinivasan, R.; Tan, L. P.; Wu, H.; Yang, P.-Y.; Kalesh, K. A.; Yao, S. Q. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, *7*, 1821.
- (10) Lietard, J.; Meyer, A.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 8795.
- (11) James, D.; Escudier, J.-M.; Amigues, E.; Schulz, J.; Vitry, C.; Bordenave, T.; Szlosek-Pinaud, M.; Fouquet, E. *Tetrahedron Letters* **2010**, *51*, 1230.
- (12) Li, X.; Gartner, Z. J.; Tse, B. N.; Liu, D. R. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 5090.

Synthesis and assembly of hybrid molecules composed of ruthenium complexes and DNA.

The present work describes the synthesis of novel hybrid supramolecules composed of ruthenium complexes and DNA, together with their assembly. The goal was to precisely situate ruthenium trisbipyridines complexes through space, controlling their exact positions and distances by use of nucleotidic sequences. The ruthenium complex geometry put together with the possible bipyridine substitutions gave rise to the idea of three-dimensional assemblies.

Two coupling strategies between the ruthenium complexes and the oligonucleotides were conceptualized : an amidation coupling and a click chemistry one. On one hand, carboxylic acid, azide or alkyne functionalized ruthenium complexes were synthesized. On the other hand, alkyne or azide modified oligonucleotides were used. From both those specific entities (i.e. modified ruthenium complexes and modified oligonucleotides) hybrid supramolecules were synthesized using both click chemistry and amidation couplings, linking one ruthenium complex to one, two identical or two different oligonucleotides.

The specific hybridization DNA property permitted the assembly of such supramolecules. Linear assemblies were made to position 1 to 7 ruthenium complexes all along a DNA duplex. The chosen oligonucleotide length and sequence allow to modulate the space between two consecutive ruthenium complexes. A star-shaped structure based on three half-complementary oligonucleotides was formed. Adding sticky ends to that peculiar structure permitted the assembly of two stars linked with an hybrid ruthenium complex-DNA molecule previously obtained. It also permitted the placement of ruthenium complexes on the periphery of such structures. Through this work, the integration and free placement of ruthenium complexes on oligonucleotidic structures was demonstrated.

Mots-clés : Assemblages moléculaires, Complexes de Ruthénium, Oligonucléotides, Click Chemistry, amidation.

Joris Irvoas, Mars 2013

Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique, UMR 5623, Université Paul Sabatier, Bat 2R1, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse

Synthèse et Assemblage de Molécules Hybrides Complexe de Ruthénium/ADN

Le travail présenté dans ce manuscrit décrit la synthèse de nouvelles supramolécules hybrides ruthénium-ADN et leur assemblage. Notre ambition était de placer précisément des complexes de ruthénium trisbipyridines dans l'espace, avec un contrôle des positions et des distances donné par des séquences nucléotidiques. La géométrie du complexe alliée à la substitution des bipyridines permettaient d'imaginer des assemblages dans les trois dimensions de l'espace.

Deux stratégies de couplage des oligonucléotides aux complexes de ruthénium ont été envisagées : couplage par amidation et par *click chemistry*. D'une part, des complexes de ruthénium fonctionnalisés par des acides carboxyliques, des azotures et des alcynes ont été synthétisés. D'autre part, des oligonucléotides fonctionnalisés par des alcynes et des azotures ont été utilisés. À partir de ces entités aux fonctions spécifiques, des supramolécules hybrides ont été synthétisées, composées d'un complexe de ruthénium lié à un oligonucléotide, à deux oligonucléotides identiques ou encore à deux oligonucléotides différents.

La propriété d'hybridation spécifique de l'ADN nous a permis d'assembler entre elles ces différentes supramolécules. Des assemblages dits linéaires ont été assemblés permettant de positionner de 1 à 7 complexes de ruthénium séparés par des duplex d'ADN. La Longueur et la séquence des oligonucléotides permettent de moduler à façon la position, donc la distance entre les complexes de ruthénium. Une structure dite étoilée a pu être obtenue en assemblant trois oligonucléotides avec des moitiés complémentaires. L'utilisation de *sticky ends* sur cette structure a permis d'utiliser les supramolécules hybrides synthétisées pour placer des complexes de ruthénium en périphérie de cette étoile. L'utilisation d'un complexe de ruthénium lié à deux oligonucléotides a permis de lier entre elles deux étoiles et de positionner des complexes de ruthénium sur leurs périphéries. À travers ces travaux, la possibilité d'intégrer des complexes de ruthénium à façon sur une structure nucléaire a été démontrée.

Mots-clés : Assemblages moléculaires, Complexes de Ruthénium, Oligonucléotides, Click Chemistry, amidation.

Joris Irvoas, Mars 2013

Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique, UMR 5623, Université Paul Sabatier, Bat 2R1, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse